

**Caractérisation d'une nouvelle protéine associée
au récepteur des hormones thyroïdiennes**

par

Simon Maltais

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
Maître en Sciences (M.Sc.)

Département de Physiologie (Endocrinologie)

Université de Sherbrooke

Février 2003



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-80620-0

Canada

TABLE DES MATIÈRES

I.	TABLE DES MATIERES.....	II
II.	LISTE DES FIGURES.....	VI
III.	LISTE DES ABBREVIATIONS.....	VIII
IV.	RESUME DU PROJET.....	XI
V.	INTRODUCTION.....	1
1.0	La glande thyroïde.....	1
2.0	Les hormones thyroïdiennes.....	3
2.1	Structure chimique.....	3
2.2	Synthèse.....	5
2.3	Transport.....	9
2.4	Contrôle de la sécrétion de la glande thyroïde.....	10
2.5	Effets des hormones thyroïdiennes.....	12
3.0	Mécanisme d'action des hormones.....	13
3.1	Actions non-génomiques des hormones thyroïdiennes.....	13
3.2	Actions nucléaires.....	15
3.2.1	La superfamille des récepteurs nucléaires.....	15
3.2.2	Le récepteurs des hormones thyroïdiennes.....	17
3.2.2.1	Isoformes.....	17
3.2.2.2	Structure.....	20
3.2.3	Liaison à l'ADN et dimérisation.....	29
3.2.4	Les corégulateurs.....	33
3.2.4.1	Corépresseurs.....	34

3.2.4.2 Coactivateurs.....	37
VI. BUT DU PROJET.....	41
VII. MATERIELS ET METHODES.....	42
4.0 Double-hybride dans les levures.....	42
4.1 Généralités.....	42
4.2 Construction de l'appât.....	43
4.3 Vecteurs d'expression.....	43
4.4 Ensemencement des levures.....	46
4.5 Titrage de la banque d'ADNc.....	46
4.6 Formule d'amplification.....	47
4.7 Amplification de la librairie plasmidique.....	47
4.8 Transformation des levures.....	48
4.9 Essais β -galactosidase sur filtre.....	50
4.10 Extraction des plasmides des levures.....	51
5.0 5'-RACE.....	52
6.0 Essai d'interaction utilisant les protéines GST.....	55
6.1 Production de protéines de fusion GST.....	55
6.2 Protéines marquées au ^{35}S	58
6.2.1 Description de la construction 14C-pKCR2.....	58
6.2.2 Transcription et traduction <i>in vitro</i>	59
6.3 Co-sédimentation.....	59
7.0 Méthode d'extraction de l'ARN.....	60
7.1 Extraction de l'ARN total (méthode 1).....	60

7.2	Extraction de l'ARN total (méthode 2).....	62
7.2.1	Traitement à la DNase et son inactivation.....	63
7.2.2	Concentration de l'ARN.....	64
7.3	Dosage de l'ARN et évaluation de sa pureté.....	64
8.0	RT-PCR.....	65
8.1	Transcription inverse.....	65
8.2	Réactions en chaîne de la polymérase.....	66
9.0	Dot Blot.....	68
9.1	Préparation de la sonde.....	68
9.2	Pré-hybridation.....	70
9.3	Hybridation.....	71
9.4	Lavage et exposition de la membrane.....	71
10.0	Cultures cellulaires et transfections.....	72
11.0	Protéines fluorescentes.....	74
11.1	Construction des vecteurs d'expression.....	74
11.1.1	TR β 2 dans pDsRed1-N1.....	74
11.1.2	14C dans pEGFP-C1.....	75
11.2	Transfection (lipofectamine).....	76
11.3	Marquage des noyaux au DAPI.....	77
VIII.	RESULTATS.....	80
12.0	Identification d'une nouvelle protéine : 14C.....	80
13.0	5'-RACE.....	81
14.0	Confirmation de l'interaction entre 14C et TR β 2.....	83

14.1	Essais d'interaction dans les levures.....	83
14.2	Interactions <i>in vitro</i> par précipitation avec protéines GST.....	83
15.0	Caractérisation de l'expression de 14C.....	88
15.1	Chez le rat.....	88
15.2	Chez l'humain et différentes lignées cellulaires.....	89
16.0	Études transcriptionnelles.....	90
17.0	Localisation subcellulaire de 14C.....	95
IX.	DISCUSSION.....	98
X.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	110
XI.	REMERCIEMENTS.....	113
XII	RÉFÉRENCES.....	115
XIII	ANNEXE A.....	147

II. LISTE DES FIGURES

Figure 1	La glande thyroïde
Figure 2	Structure chimique des hormones thyroïdiennes
Figure 3	La synthèse des hormones thyroïdiennes
Figure 4	L'axe hypothalamo-hypophysaire
Figure 5	Classes de récepteurs nucléaires et leurs principales caractéristiques
Figure 6	Domaines communs aux récepteurs nucléaires
Figure 7	Représentation schématique des isoformes des TRs
Figure 8	Structure du domaine de liaison à l'ADN du TR
Figure 9	Les corépresseurs
Figure 10	Mécanisme d'action des TRs et mécanisme d'ouverture de la chromatine
Figure 11	Les coactivateurs
Figure 12	Principe général du criblage double-hybride
Figure 13	Les vecteurs utilisés pour le double-hybride
Figure 14	Principe du 5'-RACE
Figure 15	Principe de l'essai de précipitation avec protéine GST
Figure 16	La membrane commerciale utilisée pour le dot blot
Figure 17	Principes de transfections et d'essai luciférase
Figure 18	Vecteurs fluorescents
Figure 19	Séquence nucléotidique et protéique de 14C
Figure 20	Localisation génomique de 14C

- Figure 21** 14C est issue de l'épissage de 3 exons
- Figure 22** Essai d'interaction avec protéine GST
- Figure 23** Caractérisation de l'expression de 14C chez le rat par RT-PCR
- Figure 24** Caractérisation de l'expression de 14C chez le fœtus, l'adulte et différentes lignées cellulaires
- Figure 25** Caractérisation de l'expression de l'ubiquitine chez le fœtus, l'adulte et différentes lignées cellulaires
- Figure 26** Études transcriptionnelles préliminaires sur TRETk
- Figure 27** Études par microscopie de fluorescence

III. LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AdNT	Adenine nucleotide translocase
AD	Domaine d'activation
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
AR	Récepteur des androgènes
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
D.O.	Densité optique
DR	Répétition directe
ER	Récepteur des oestrogènes
GFP	Green fluorescent protein
GPCR	Récepteur couplé à une protéine G
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GSP	Gene specific protein
GST	Glutathione-S-transférase
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone déacétylase
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HRE	Élément de réponse aux hormones
HSP	Heat shock protein
HT	Hormones thyroïdiennes

IP	Palindrome inversé
LBD	Domaine de liaison au ligand
MR	Récepteur des minéralocorticoïdes
MCS	Multiple cloning site
NcoR	Nuclear receptor corepressor
NR	Récepteur nucléaire
PBS	Solution phosphate saline
PCAF	p300/CBP associated factor
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase
PPAR	Peroxisome proliferator activating receptor
PR	Récepteur de la progestérone
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
RN	Récepteur nucléaire
RT	Réaction de transcription inverse
RXR	Récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque
SMRT	Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
SNC	Système nerveux central
SRC	Steroid receptor coactivator
T ₃	3,3',5'-Triiodothyronine
T ₄	3,3',5,5'-Tétraiodothyronine ou thyroxine
TBG	Thyroxin binding globulin
TBPA	Préalbumine liant la thyroxine
TdT	Terminal deoxynucleotidyl-transferase

TFIIB	Transcription factor IIB
TR	Récepteur des hormones thyroïdiennes
TRE	Élément de réponse aux hormones thyroïdiennes
TRH	Thyrotropin releasing hormone
TSH	Thyroid stimulating hormone
VDR	Récepteur de la vitamine D

IV. RESUME DU PROJET

Les hormones thyroïdiennes (T_3) sont impliquées dans un large éventail d'événements physiologiques et elles contrôlent, *via* leurs récepteurs nucléaires (TRs), la transcription de plusieurs gènes. La T_3 gouverne ainsi positivement ou négativement l'expression de gènes cibles. Des 4 isoformes des TRs, seule $TR\beta_2$ est exprimée majoritairement dans l'hypophyse et l'hypothalamus, où elle joue un rôle essentiel dans la régulation négative par la T_3 . La régulation des TRs s'effectue par l'action de certaines protéines dites corégulatrices venant moduler leurs actions sur les gènes cibles. Ces corégulateurs interagissent pour la plupart avec la portion N-terminale du récepteur où se retrouve le domaine de liaison du ligand. Or, on découvre de plus en plus que le domaine de liaison à l'ADN des TRs (DBD), domaine très conservé parmi les récepteurs nucléaires (RNs), possède la capacité de lier plusieurs corégulateurs, eux-mêmes susceptibles d'affecter la régulation de l'activité transcriptionnelle. Des articles récents ont démontré l'importance de ce domaine pour le transport nucléocytoplasmique, les phénomènes d'hétérodimérisation ou la liaison de certaines protéines impliquées dans la régulation de la transcription par les RNs.

Afin de trouver de nouveaux cofacteurs interagissant avec $TR\beta_2$, nous avons utilisé la méthode double-hybride pour cribler une banque d'ADNc de cerveau fœtal humain avec comme appât une portion de $TR\beta_2$ (89-220). Cette région comprend le domaine de liaison à l'ADN commun à toutes les isoformes des TRs en plus de la portion 89-116 de $TR\beta_2$. Différents clones furent identifiés, dont 14C, un ADN codant pour une protéine non-répertoriée d'au moins 184 acides aminés et contenant un domaine hélicoïdal.

Utilisant la séquence identifiée, nous avons comparé 14C avec les banques de séquences génomiques et protéiques disponibles. La protéine identifiée ne correspondait à aucune autre protéine déjà répertoriée. 14C se situe sur le bras long du chromosome 5 humain, plus particulièrement en position 5q23.1. Cette protéine est issue d'au moins trois exons. L'absence de codon stop en amont de l'ATG de départ de la séquence nous indique que celle-ci est possiblement incomplète. L'expression de 14C a été caractérisée dans des tissus de rat par RT-PCR. Nous avons observé que 14C est exprimée de façon ubiquitaire dans les différents tissus étudiés. 14C possède donc un homologue du moins partiel chez le rat. L'étude d'ARN provenant de tissus humains utilisant la technique du dot blot a permis de confirmer l'expression ubiquitaire quoique faible de 14C et de mettre en évidence son absence possible dans les ovaires. Suite à la confirmation de l'interaction entre 14C et $TR\beta_2$ dans les levures, des études ont été entamées afin de cerner cette interaction par la technique de «GST-pulldown». Ces études ont reconfirmé l'interaction entre 14C et $TR\beta_2$ et localisée celle-ci au DBD. Des études transcriptionnelles préliminaires par essai luciférase sur un rapporteur positif ont montré que 14C ne semblait pas influencer cette fonction des TRs. Enfin, une analyse de colocalisation utilisant des protéines fluorescentes montre que, comme $TR\beta_2$, 14C se situe principalement au noyau et à son pourtour en absence de T_3 .

La découverte stimulante de ce cofacteur pourrait contribuer à notre compréhension du mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes.

V. INTRODUCTION

1.0 LA GLANDE THYROÏDE

La glande thyroïde est la première glande endocrine à se développer chez l'embryon humain. Elle prend ses origines d'un épaissement de l'endoderme du plancher du pharynx primaire et commence à prendre forme 24 jours après la fécondation. L'épaississement devient vite une excroissance : le diverticule thyroïdien. La glande thyroïde poursuit son développement et descend le long du cou pour passer devant l'os hyoïde et le cartilage laryngé. Elle demeure liée à la langue pour une courte période de temps par un tube étroit : le canal thyroglosse.

Au début de sa formation, le diverticule thyroïdien est vide, mais il devient rapidement solide et se divise en deux lobes (droit et gauche) rattachés par une structure centrale : l'isthme. À la 7^e semaine, la glande thyroïde atteint sa forme définitive et se situe habituellement à sa position finale au niveau du cou. Résorbé, le canal thyroglosse est à ce moment normalement disparu. Seul le *foramen cecum* à la base de la langue nous rappelle l'ouverture embryonnaire de ce dernier. Un lobe pyramidal peut parfois persister et s'étendre au-dessus de l'isthme (Greenspan et al., 2001 ; Moore et Persaud, 1998). Voir la Figure 1 pour une représentation anatomique de la glande thyroïde.

La glande thyroïde représente la plus grande glande purement endocrine chez l'homme. Pesant de 10 à 20 grammes chez un individu adulte normal, elle prend la forme d'un papillon. Celle-ci repose en profondeur sous les muscles sternothyroïdiens et sternohyoïdiens entre les vertèbres C5 et T1. Constituée de deux lobes (droit et gauche), la glande thyroïde est située dans la partie antérieure du cou où elle repose sur la trachée, en dessous du larynx. Les deux lobes sont reliés par l'isthme au niveau des 2^e et 3^e anneaux cartilagineux de la trachée. Une gaine fibreuse fait figure de capsule et s'enroule autour de celle-ci en projetant profondément des prolongements appelés *septa*.

La vascularisation de la glande thyroïde est très importante. Les artères thyroïdiennes supérieures et inférieures sont responsables de son irrigation. Normalement, la première branche de l'artère carotide externe (l'artère thyroïdienne supérieure) est responsable d'irriguer les faces antérieures et supérieures de la glande, alors qu'une branche du tronc thyrocervical (artère thyroïdienne inférieure) provenant de l'artère sous-clavière irrigue l'aspect postérieur et inférieur de cette dernière. Le drainage veineux des pôles s'effectue respectivement *via* les veines thyroïdiennes supérieures, moyennes et inférieures. Les veines supérieures et moyennes se jettent dans la veine jugulaire interne, tandis que la veine inférieure se déverse dans la veine brachiocéphalique (Moore et al., 1999).

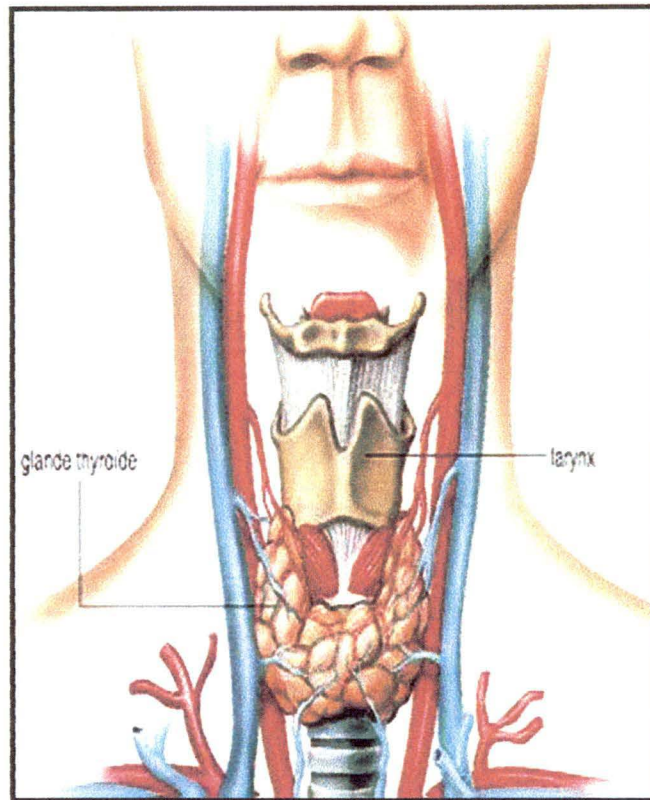
D'un point de vue histologique, la thyroïde est une glande endocrine très organisée. Son parenchyme se compose de plusieurs groupes de cellules folliculaires entassées de façon

compacte. Sphériques, les follicules possèdent un diamètre variant entre 0,05 et 1,0 millimètres. Le follicule thyroïdien est tapissé d'un épithélium simple qui synthétise et sécrète les hormones thyroïdiennes. Les cellules folliculaires ont l'ultrastructure morphologique d'une cellule très active en synthèse protéique (Figure 3). En effet, leur cytoplasme possède un réticulum endoplasmique rugueux très développé et un appareil de Golgi très proéminent. Les cellules épithéliales des follicules varient dans leur forme en fonction de leur activité. Elles peuvent passer d'une forme cuboïde à cylindrique dépendant de leur niveau fonctionnel. La surface apicale de ces cellules fait face à la lumière du follicule qui est remplie d'une substance protéique homogène, eosinophile et principalement constituée de thyroglobuline que l'on nomme colloïde thyroïdien. La thyroglobuline est une glycoprotéine de 5496 acides aminés synthétisée et sécrétée par les cellules épithéliales des follicules. Elle est étroitement liée à la formation des hormones thyroïdiennes. En coupes histologiques, on peut retrouver un autre type de cellules appelées cellules parafolliculaires (cellules à calcitonine ou cellules C) (Leeson et al., 1988).

2.0 LES HORMONES THYROÏDIENNES

2.1 STRUCTURE CHIMIQUE

Les hormones thyroïdiennes se présentent sous plusieurs formes. Les deux principales étant la 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) et la 3,5,3',5'-tetraiodothyronine (T_4), cette dernière se nommant



Tiré de Moore et al., 1999.

Figure 1

La glande thyroïde et les structures anatomiques qui l'entourent.

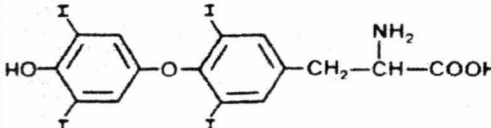
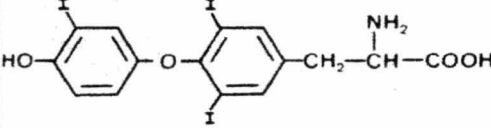
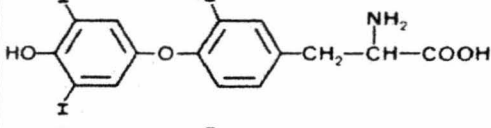
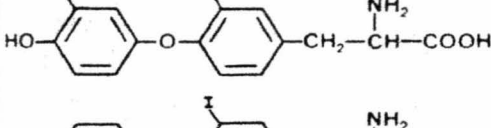
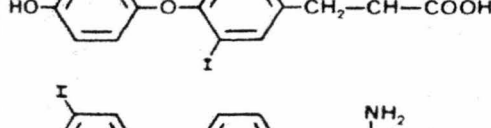
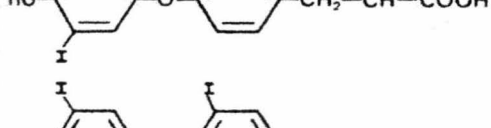
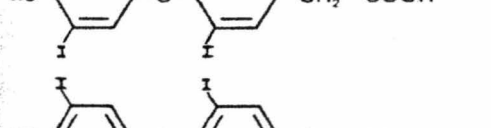
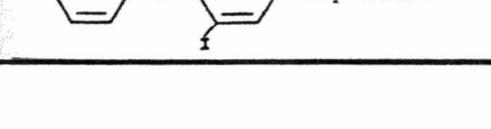
Cette glande endocrine est située dans la partie antérieure du cou où elle repose sur la trachée, en dessous du larynx. Elle repose en profondeur sous les muscles sternothyroïdiens et sternohyoïdiens entre les vertèbres C5 et T1.

aussi thyroxine. Ces hormones sont toutes deux composées de deux anneaux phénoliques et d'une chaîne aliphatique. Sur les anneaux phénoliques, certains atomes de carbone peuvent être iodés pour produire les différentes formes sous lesquelles se présentent les hormones thyroïdiennes : en position 3, 5 et 3' pour la T_3 ou 3,5,3',5' pour la T_4 . En ce qui concerne la T_3 , seule la position des trois molécules d'iode distingue la forme active de la forme inactive (rT_3). On retrouve à la Figure 2 la structure complète des hormones thyroïdiennes ainsi que la structure des composés qui leur sont apparentés (Greenspan et al., 2001).

2.2 SYNTHÈSE

Les principales hormones sécrétées par la glande thyroïde sont la T_3 et la T_4 . Leur synthèse implique cinq étapes majeures soit : (1) le transport actif de l'iode (I^-) dans la cellule thyroïdienne à travers la membrane basale; (2) l'oxydation de l'iode et l'iodination des résidus tyrosines dans la thyroglobuline; (3) la formation de T_3 et T_4 par le couplage des molécules d'iodotyrosine dans la thyroglobuline; (4) la protéolyse de la thyroglobuline et la libération d'iodotyrosines et d'iodotyrosines; (5) la déiodination des iodotyrosines dans la cellule thyroïdienne avec recyclage de l'iode libéré (voir Figure 3).

2.2.1 *Transport actif de l'iode (I^-) dans la cellule folliculaire.*

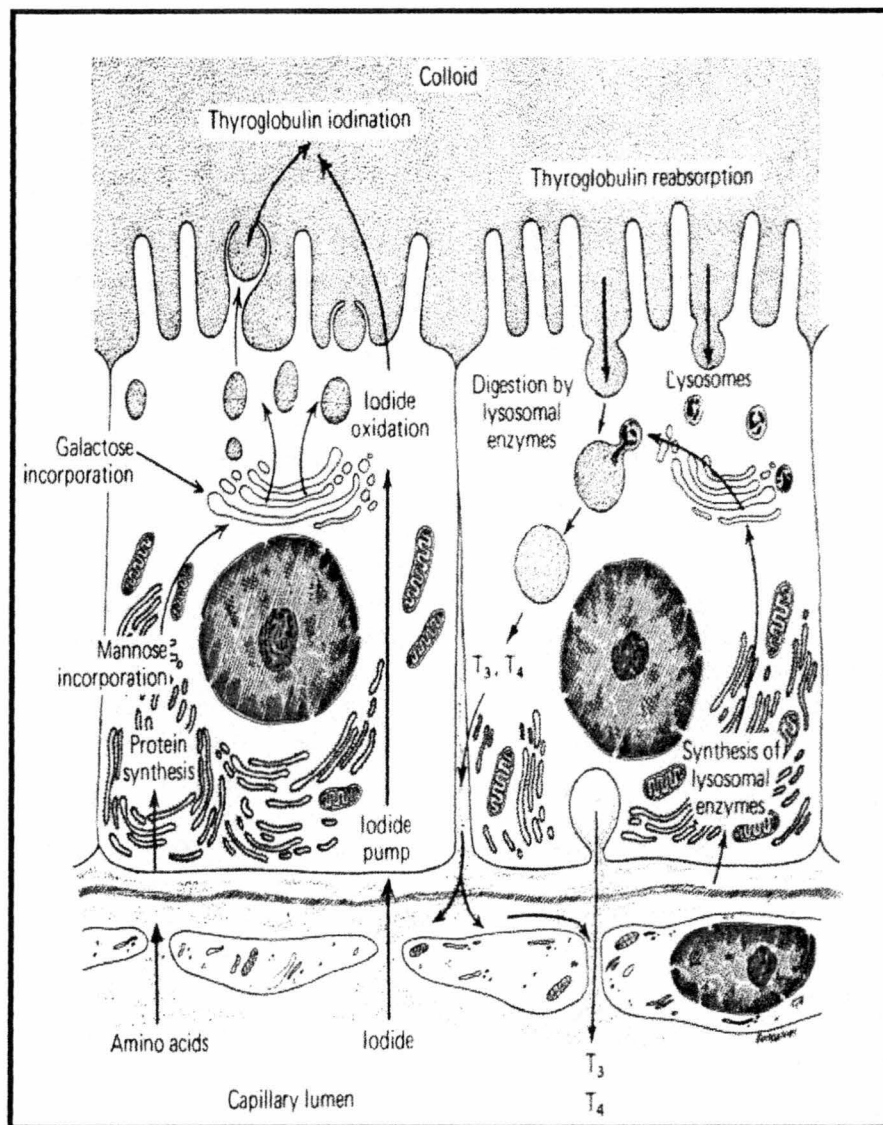
	Hormone	Common Name	Biologic Activity
	L-3,5,3',5'-Tetraiodothyronine	L-Thyroxine; T ₄	100
	L-3,5,3'-Triiodothyronine	T ₃	300–800
	L-3,3',5'-Triiodothyronine	Reverse T ₃ ; rT ₃	< 1
	DL-3,3'-Diiodothyronine	3,3'-T ₂	< 1–3
	DL-3,5-Diiodothyronine	3,5-T ₂	7–11
	DL-3',5'-Diiodothyronine	3'5'-T ₂	0
	L-3,5,3',5'-Tetraiodothyroacetic acid	Tetrac	7 10–50
	L-3,5,3'-Triiodothyroacetic acid	Triac	7 25–35

Tiré de Greenspan et al., 2001.

Figure 2

La structure chimique des hormones thyroïdiennes.

Cette figure montre que l'activité biologique des hormones thyroïdiennes dépend de la disposition des atomes d'iode sur celles-ci. L'iodination est un mécanisme important de l'activité biologique de ces hormones.



Tiré de Greenspan et al., 2001.

Figure 3

La synthèse des hormones thyroïdiennes.

L'iode est transportée de façon active dans la cellule où elle est oxydée et incorporée aux résidus tyrosines dans la thyroglobuline. La T₃ et T₄ sont formées par couplage des molécules d'iodotyrosine, puis une protéolyse de la thyroglobuline libère l'iodotyronines et l'iodotyrosines. L'iode libérée est ensuite recyclée.

L'iode sous forme de I^- est transporté à travers la membrane basale du follicule par un mécanisme protéique intrinsèque de type symporteur Na^+/I^- . Le gradient imposé aux ions sodium par l'activation d'une pompe Na^+-K^+ ATPase (mouvement des ions sodium vers l'extérieur du follicule) est à la base du transport de l'iode dans la cellule thyroïdienne. L'iode utilise ainsi l'énergie de ce gradient pour pénétrer dans la cellule en échange de Na^+ . Chez l'humain, ce transport actif permet à la glande de maintenir une concentration d'iode libre intrinsèque de 30 à 100 fois supérieure à celle du plasma.

2.2.2 Oxydation de l'iode et iodination des résidus tyrosines.

À l'intérieur de la cellule thyroïdienne, à la jonction entre la cellule et le colloïde, l'iode est rapidement oxydé par l' H_2O_2 sous l'action catalytique d'une enzyme très importante : la thyroperoxydase. Stimulée par la TSH, cette enzyme permet une conversion de l'iode en un métabolite intermédiaire extrêmement actif et son incorporation aux résidus de la thyroglobuline.

2.2.3 Formation de T_3 et T_4 par le couplage des molécules d'iodotyrosine.

Le couplage des résidus iodotyrosine est aussi catalysé par la thyroperoxydase. Dans la thyroglobuline, deux molécules de diiodotyrosine (DIT) sont assemblées pour former la

thyroxine (T_4) ou une molécule de monoiodotyrosine est couplée à la DIT pour produire la triiodothyronine (T_3).

2.2.4 Protéolyse de la thyroglobuline, sécrétion de T_3 et T_4 et recyclage de l'iode.

Des enzymes sont synthétisées par le réticulum endoplasmique rugueux du follicule et emmagasinées par l'appareil de Golgi dans des lysosomes. Ces structures, entourées d'une membrane, possèdent un milieu intérieur acide riche en enzymes protéolytiques (protéases, endopeptidases, phosphatases, etc). À la limite entre le colloïde et la cellule, un phénomène de pinocytose permet de mettre dans des vésicules une partie du colloïde. Par la suite, il y a fusion entre les lysosomes et les vésicules et la thyroglobuline est hydrolysée pour libérer T_4 , T_3 , DIT, MIT, peptides et acides aminées. La T_3 et T_4 sont relâchées dans la circulation, alors que la DIT et la MIT sont déiodinées pour permettre un recyclage de l'iode (Greenspan et al., 2001).

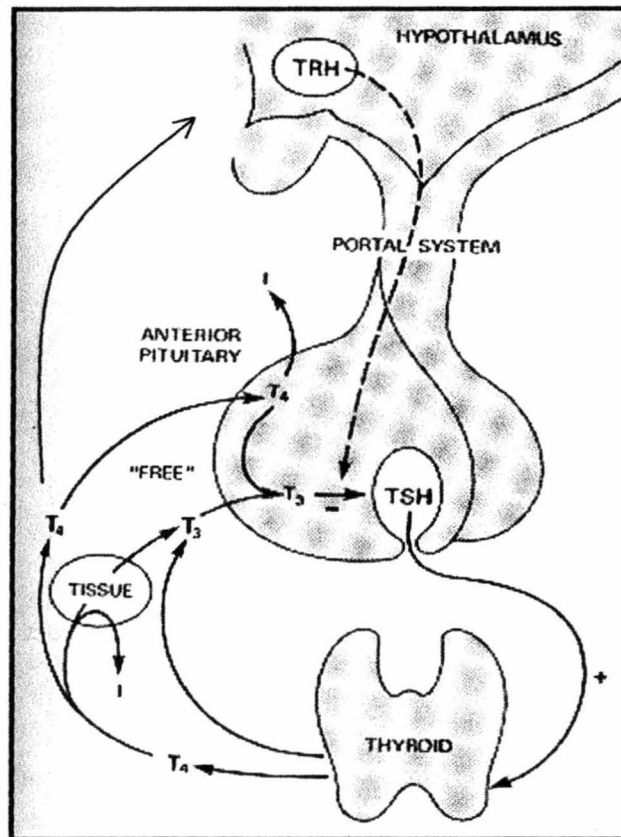
2.3 TRANSPORT

Les hormones thyroïdiennes sont des composés liposolubles. Dans le sang, ils sont transportés par différentes protéines qui leur permettent de voyager et d'accéder à leurs organes cibles. Même si seulement 0,04% de la T_4 et 0,4% de la T_3 sont libres, c'est cette portion active qui est responsable de l'activité hormonale. Les hormones thyroïdiennes sont transportées par trois protéines principales dont deux possèdent une capacité de liaison spécifique : la globuline liant

la thyroxine (TBG) et la préalbumine liant la thyroxine (TBPA). L'albumine peut aussi lier les hormones thyroïdiennes mais de façon non-spécifique. Bien que leur rôle de transporteur soit bien défini, ces protéines possèdent plusieurs autres fonctions : servir de réservoir de thyroxine pouvant être utilisée en cas de besoin et fournir une protection tissulaire à la décharge excessive d'hormones thyroïdiennes (Greenspan et al., 2001).

2.4 CONTRÔLE DE LA SÉCRÉTION DE LA GLANDE THYROÏDE

La croissance et la fonction de la glande thyroïde sont contrôlées par un système très précis, c'est l'axe hypothalamo-hypophysaire. Comme plusieurs autres régulations endocrines, il existe pour les hormones thyroïdiennes un rétrocontrôle négatif serré qui permet la régulation fine de leur niveau circulant. Une représentation schématique du mode d'action de ce système se retrouve à la Figure 4. Dans cet axe, l'hypothalamus constitue le point de départ et ce dernier est activé en réponse à une baisse du niveau circulant d'hormones thyroïdiennes. À ce moment, les noyaux supraoptiques et supraventriculaires produisent un tripeptide, la thyroïdolibérine (TRH), qui, *via* le système porte hypophysaire, s'achemine vers l'hypophyse. Au niveau de l'hypophyse, la TRH active un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G (GPCR) et stimule la transcription et la sécrétion d'une glycoprotéine, la thyroïdostimuline (TSH). Cette dernière se rend à la glande thyroïde et se lie à un GPCR pour stimuler à son tour la sécrétion d'hormones thyroïdiennes et la croissance de la glande. Or, il existe une régulation étroite de cet axe, c'est le rétrocontrôle négatif. Lorsque les niveaux



Modifié de Greenspan et al., 2001.

Figure 4

L'axe hypothalamo-hypophysaire

Cette figure illustre le contrôle des niveaux circulants d'hormones thyroïdiennes. Une baisse de la fraction libre de T_4 stimule, respectivement, la production de TRH et de TSH par l'hypothalamus et l'hypophyse. La TSH active la libération d'hormones thyroïdiennes afin de rétablir l'équilibre. Une hausse de T_4 inhibe l'axe de façon réciproque.

circulants d'hormones thyroïdiennes augmentent, il y a inhibition du processus et diminution de la production de TRH et TSH. Dans la situation où la quantité d'hormones thyroïdiennes est basse, l'axe est stimulé, les niveaux de TRH et TSH augmentent, puis l'équilibre est rétabli. Cette régulation précise permet un niveau circulant d'hormones thyroïdiennes constant et un équilibre physiologique (Greenspan et al., 2001).

2.5 EFFETS DES HORMONES THYROÏDIENNES

Les hormones thyroïdiennes agissent de façon systémique. Un excès ou une déficience en hormones thyroïdiennes peut mener à un déséquilibre sérieux et à divers problèmes métaboliques. Elles agissent à plusieurs niveaux sur la différenciation, la croissance et le développement. La thyroïde et le système de sécrétion de TSH par l'hypophyse antérieure sont fonctionnels vers la onzième semaine de vie fœtale humaine (Moore et al., 1998). Puisque l'on retrouve une grande quantité de désiodinase de type 3 dans le placenta, la T_4 et la T_3 maternelles sont inactivées et on note que la quantité d'hormones thyroïdiennes libres s'acheminant vers le fœtus est très faible. Très rapidement, le fœtus en développement devient dépendant de sa propre sécrétion d'hormones thyroïdiennes, bien que le niveau d'hormones thyroïdiennes maternelles demeure important. Une déficience en hormones à ce moment peut entraîner de graves problèmes dont : un retard dans le développement du système nerveux central et dans la maturation squelettique conduisant vers le crétinisme.

De plus, les hormones thyroïdiennes jouent plusieurs autres rôles dans l'organisme. Elles ont des effets inotropes et chronotropes positifs sur le système cardiovasculaire, maintiennent les réponses hypoxiques et hypercapniques respiratoires centrales, activent la portion sympathique du système autonome, augmentent la consommation d'oxygène, la production de chaleur et le niveau métabolique de base, stimulent la motilité gastrointestinale, font varier certains paramètres hématologiques, augmentent le "renouvellement" osseux et affectent les jonctions neuromusculaires. Elles ont aussi plusieurs effets endocriniens dont l'augmentation des niveaux d'hormones stéroïdiennes, de croissance et le cortisol (Forrest et al, 2000 ; Greenspan et al., 2001).

3.0 MÉCANISME D'ACTION DES HORMONES THYROÏDIENNES

3.1 ACTIONS NON-GENOMIQUES DES HORMONES THYROÏDIENNES

Certaines actions non-génomiques des hormones thyroïdiennes sont connues, mais il est admis que leur site d'action principal se situe au niveau nucléaire (Lazar MA, 1993; Brent GA, 1989). Or, depuis plus d'une dizaine d'années, on se rend compte que les hormones thyroïdiennes agissent par des mécanismes dit extranucléaires (Harris DR et al., 1993; Ojamaa K et al., 1993). Ces actions s'effectuent dans un large éventail de domaines cellulaires tels la membrane plasmique, au niveau de différents organelles, au cytosquelette et dans le cytoplasme (Davis et al., 1996).

En ce qui concerne la membrane plasmique, on suspecte l'existence d'un récepteur membranaire identifié dans le foie de rat (Graham et Green, 1969). Il a aussi été montré que les hormones thyroïdiennes augmentent l'activité d'un transporteur de glucose dans certains types cellulaires chez le rat (Segal J et al., 1979 et 1990) par un mécanisme complètement extranucléaire qui impliquerait les adénylates cyclases et un système Ca^{2+} -calmoduline (Segal J, 1986 et 1989). Il existe également des travaux qui montrent que d'une manière extranucléaire, les hormones thyroïdiennes prolongent l'inactivation des canaux Na^+ à la membrane plasmique dans des myocardiomyocytes de rat (Harris et al., 1991). Dans plusieurs systèmes, il apparaît évident que les hormones thyroïdiennes augmentent l'activité de la Ca^{2+} -ATPase à la membrane plasmique (Davis FB et al., 1982-83; Rudinger A et al., 1984; Warnick PR et al., 1993; Lawrence WD et al., 1984). Il a été aussi observé qu'il existe, dans des préparations synaptosomales du cortex cérébral d'embryon de poulet, des sites de haute affinité de liaison pour les hormones thyroïdiennes couplées à une grande activité des récepteurs couplés aux protéines G (Giguere A et al., 1996). Ces résultats sont très pertinents, car on reconnaît l'importance des hormones thyroïdiennes dans le développement du cerveau normal, la myélinisation cellulaire et la dégradation de certains neurotransmetteurs (Dussault et Ruel, 1987; Porterfield et Hendrich, 1993; Anderson et al., 2001).

Les hormones thyroïdiennes agissent aussi sur différents organelles d'une manière indépendante du noyau. Leurs actions mitochondriales représentent aujourd'hui un vif intérêt. Il est généralement admis, mais très peu compris, que les hormones thyroïdiennes augmentent la consommation mitochondriale d'oxygène et, par conséquent, tout le métabolisme

cellulaire. D'une part, certains auteurs montrent que le site d'action de la T_3 dans les mitochondries du foie de rat est l'adénide nucléotide translocase (AdNT) située dans la membrane interne des mitochondries et favorisant l'entrée d'ADP dans cette dernière (Sterling K et al., 1977; Sterling K et al., 1995; Mowbray J et al. 1984). D'autres auteurs pensent que l'ATP synthase est le site d'action principal de la T_3 (Hafner RP et al., 1990).

Au niveau du cytosol, on note que plusieurs protéines lient les hormones thyroïdiennes (Yoshida K et al., 1979; Hashizume K et al., 1989). Aussi, on remarque que dans certains types cellulaires, les hormones thyroïdiennes activent de façon non-génomique des protéines kinases cytosoliques (Lawrence WD et al. 1989). Au niveau du cytosquelette, les hormones thyroïdiennes régulent de façon rapide la polymérisation des filaments d'actine dans des préparations de cellules gliales (Siegrist-Kaiser CA et al., 1990). Quoique très intéressantes, ces données et leurs implications cellulaires demeurent néanmoins obscures.

3.2 ACTIONS NUCLÉAIRES

3.2.1 LA SUPERFAMILLE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES

Les récepteurs nucléaires jouent un rôle important dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Ils forment un lien direct entre des signaux extracellulaires et des réponses transcriptionnelles. Leur particularité fascinante est de regrouper, en une seule entité protéique, la capacité de se fixer l'ADN, de fixer un ligand et de contrôler la transcription

(Gronemeyer H et al., 1995). Parmi ces ligands figurent les hormones thyroïdiennes (Lavau C et al., 1994 ; Deutsch J et al., 1993) dont la majorité des actions s'exercent au niveau génomique (Yen, 2001). Liposolubles, les hormones thyroïdiennes traversent facilement la membrane plasmique par transport facilité où elles vont lier leurs récepteurs nucléaires (TRs), induire un changement de conformation des TRs, et permettre l'activation de la transcription de leurs gènes cibles (Mangelsdorf et al., 1995). Ils agissent ainsi à titre de facteur de transcription activés par leur ligand (Sap et al., 1986 ; Weinberger et al., 1986). Les TRs sont membres de la superfamille des récepteurs nucléaires qui englobe aussi, à titre d'exemple, les récepteurs de l'acide rétinoïque, la vitamine D, les acides gras et les prostaglandines. On peut aussi compter dans cette famille les récepteurs orphelins ayant comme particularité d'avoir été clonés avant que l'on connaisse leur ligand (Evans RM, 1988 ; Glass CK, 1994). De ces différents récepteurs on peut former deux classes dont la première regroupe les récepteurs stéroïdiens comprenant les glucocorticoïdes (GR), les minéralocorticoïdes (MR), la progestérone (PR), les androgènes (AR) et les oestrogènes (ER). La seconde classe de récepteurs (non-stéroïdiens) comprend les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), de l'acide rétinoïque (RAR), de l'acide 9-cis rétinoïque (RXR), de la vitamine D₃ (VDR) et des récepteurs orphelins.

Pour les récepteurs stéroïdiens, il existe une particularité qui les différencie des récepteurs de type non-stéroïdiens. En effet, en absence de leur ligand, on remarque que ces récepteurs nucléaires s'associent dans le cytoplasme à un complexe multimérique comprenant plusieurs protéines dites chaperones (heat shock protein : hsp) comme hsp 90, hsp 70 et hsp

56 qui les maintiennent au niveau du cytosol (Greenspan F et al., 2001). En présence du ligand stéroïdien liposoluble, le récepteur se dissocie du complexe multimérique, ce qui permet le transport du récepteur au noyau et son action au niveau de l'ADN. En contrepartie, les récepteurs de classe II peuvent lier l'ADN en absence et en présence de leur ligand et ne s'associent pas aux hsp (Meier, 1997 ; Greenspan F et al., 1997) (voir Figure 5).

Tous les récepteurs nucléaires sont caractérisés par une organisation structurale particulière en domaines fonctionnels indépendants les uns des autres (Laudet V et al., 1992). On peut facilement représenter ces régions en 6 domaines tel qu'illustré à la Figure 6 : le domaine A/B situé à l'extrémité N-terminale, le domaine C ou de liaison à l'ADN, le domaine charnière (D) et le domaine de liaison au ligand (E/F) en C-terminal (Munoz et Bernal, 1997). Nous reviendrons sur ces domaines et leurs différentes fonctions dans la section traitant de la structure spécifique du récepteur des hormones thyroïdiennes.

3.2.2 LE RECEPTEUR DES HORMONES THYROÏDIENNES

3.2.2.1 Isoformes

Le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR) a été identifié en 1986, comme produit du proto-oncogène *c-erbA*, l'homologue cellulaire de l'oncogène viral *erbA* responsable de l'érythroblastose aviaire (Sap J et al., 1986; Weinberger et al., 1986). Il fut alors tout de suite évident que ce récepteur était membre de la grande famille des récepteurs nucléaires faisant

figure de facteurs de transcription dépendants du ligand (Murray MB et al., 1988). *C-Erb-A α* et *C-Erb-A β* , respectivement situés chez l'humain sur les chromosomes 17 et 3, produisent les différentes isoformes des TRs (Evans, 1988; Yen et al., 2001) (voir figure 7). Ces deux gènes sont exprimés de façon différentielle, souvent redondante, ce qui suggère un réseau complexe où le produit de ces gènes joue plusieurs fonctions à la fois individuelles et communes (Murray MB et al., 1988; Yaoita Y et al., 1990). Un arrangement similaire est observé chez les mammifères, les amphibiens et les poissons, ce qui suggère que l'interaction entre ces deux gènes représente, sur le plan phylogénique, une caractéristique fondamentale et hautement adaptative à travers les espèces vertébrées (Banker DE et al., 1991; Yamano K et al., 1998). Ces récepteurs sont de plus très conservés chez la souris, le rat, le poulet et l'être humain, ce qui montre la présence de ces multiples isoformes à travers une grande variété d'espèces (Lazar, 1993). Les différentes isoformes des récepteurs des hormones thyroïdiennes sont aussi exprimées de façon différentielle au cours du développement, ce qui, tout en montrant l'importance de la modulation par les hormones thyroïdiennes dans le développement, appuie bien une variété de fonction des TRs (Bradley et al., 1992; Forrest, 1994; Forrest et al., 1990; Murray et al., 1988; Strait et al., 1990; Wood et al., 1991; Yaoita et Brown, 1990).

Tout d'abord, chez l'humain, on connaît deux produits du gène *C-Erb-A α* qui sont issus de l'épissage alternatif de leurs ARN pré-messagers : TR α 1 (410 acides aminés : a.a.) et TR α 2 (490 a.a.). Il existe aussi une autre variante retrouvée chez le rat et absente chez

l'humain : TR α 3 (Mitsubishi TG et al., 1988). Ces trois isoformes varient uniquement par leur portion C-terminale chez les mammifères. Seul TR α 1 lie la T₃ et l'ADN et est ainsi un récepteur fonctionnel chez l'humain. TR α 2, pour sa part, ne lie pas les hormones thyroïdiennes, car les 40 a.a en C-terminal (a.a 370 à 410) nécessaires à cette fonction sont absents. De plus, il a été démontré que TR α 2 et TR α 3 sont de faibles dominants négatifs *in vitro* (Lazar et al., 1988; Mitsunashi et al., 1988; Sap et al., 1986; Weinberger C et al., 1986). Par des études de transfection *in vitro*, il semble que TR α 2 peut interférer avec la transactivation des TRs en présence du ligand, mais son rôle de modulateur de la fonction des TRs demeure controversé (Koenig RJ et al., 1989; Tagami T et al., 1998). Des études récentes ont montré la présence d'un promoteur dans l'intron 7 de TR α qui génère deux variantes tronquées du récepteur, $\Delta\alpha$ 1 et $\Delta\alpha$ 2, qui agissent comme répresseurs *in vitro*, mais qui n'ont aucun rôle physiologique connu à ce jour (Chassande et al., 1997). En ce qui concerne TR α 1, on le retrouve exprimé de façon ubiquiste avec une prédominance au niveau du myocarde, où il semble jouer un rôle majeur dans la régulation du rythme cardiaque (Yen et al., 2001; Forrest D et al., 2000).

Le gène *C-Erb-A β* , lui, utilise de façon différentielle trois promoteurs pour produire trois variantes fonctionnelles en N-terminal du récepteur des hormones thyroïdiennes : TR β 1 (461 a.a.), TR β 2 (514 a.a.) et TR β 3 (390 a.a.), tous ayant la capacité de lier la T₃, l'ADN et de moduler la transcription de gènes cibles (Sjöberg M et al., 1995; Hodin RA et al., 1989; Langlois M-F et al., 1997; Graham W, 2000). Comme TR α 1, TR β 1 et TR β 3 sont aussi

exprimées de façon ubiquiste. TR β 1 prédomine néanmoins dans le foie, les os et le système nerveux central (Sakurai et al., 1989; Schwartz et al., 1992), alors que TR β 3, lui, s'exprime préférentiellement dans le poumon et la rate (Graham W, 2000). Au contraire des autres isoformes des TRs, TR β 2 possède une distribution beaucoup plus spécifique. En effet, on la retrouve principalement dans l'hypophyse, l'hypothalamus, l'oreille interne, la rétine en développement et certaines populations neuronales mineures du système nerveux central (Bradley DJ et al., 1992; Hodin RA et al., 1989; Wood WM, et al., 1991; Sjöberg M et al., 1992; Lechan et al., 1993; Li et Boyages, 1996; Schwartz et al., 1994).

3.2.2.2 Structure

Comme nous l'avons déjà mentionné, les récepteurs nucléaires sont caractérisés par une organisation structurale particulière en domaines fonctionnels et le récepteur des hormones thyroïdiennes ne fait pas exception à cette règle (Gronemeyer H et al., 1995; Deutsh J et al., 1994; Laudet V et al., 1992). Ce récepteur est composé de chaînes polypeptidiques simples comprenant six domaines (Yen P et al., 2001; Evans RM, 1988; Mangelsdorf DJ et al., 1995). On peut voir en représentation schématique la répartition de ces domaines à la Figure 7.

Peu conservé à travers les différents récepteurs nucléaires, le domaine A/B, en amino-terminal, contient le domaine AF-1 impliqué dans la transactivation indépendante du ligand. Ceci corrobore avec la capacité de TR α 1 à lier le facteur de transcription TFIIB, une protéine

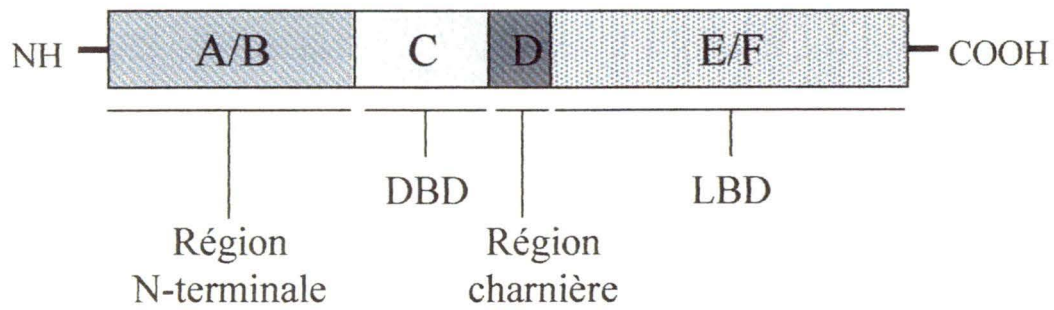
TYPES	<u>TYPE I</u>	<u>TYPE II</u>
REPRÉSENTANTS	Récepteurs stéroïdiens (GR, MR, PR, AR)	TR, RAR, RXR, ER, VDR, PPAR
LOCALISATION	Cytoplasmique et nucléaire	Principalement nucléaire
LIAISON À L'ADN	Dépendante du ligand	Indépendante du ligand
ÉLÉMENTS DE RÉPONSE	Palindromes	Divers (Pal, DR, PalI)
STRUCTURE FAVORISÉE	Homodimère	Monomères et Homo/hétérodimères

Figure 5

Classes de récepteurs nucléaires et leurs principales caractéristiques.

Ce tableau illustre les caractéristiques qui nous permettent de différencier les deux grands types de récepteurs nucléaires (type I et II).

a)



b)

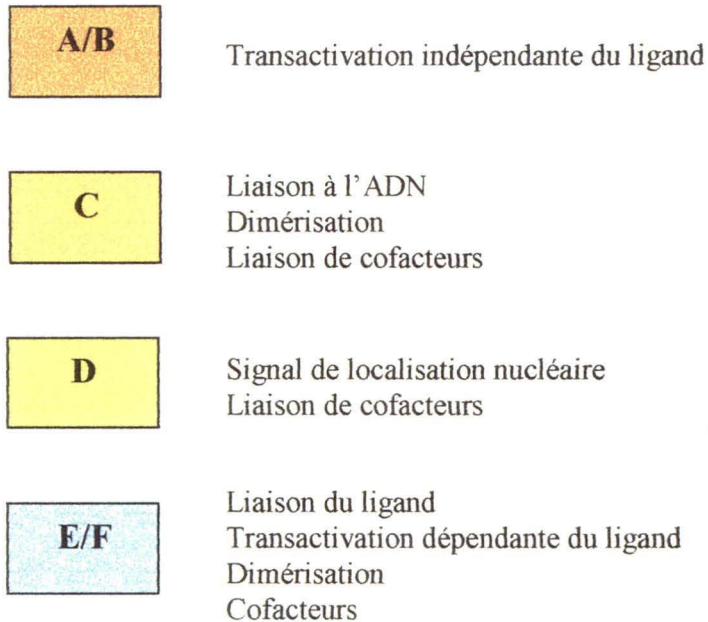


Figure 6

Domaines communs aux récepteurs nucléaires (RNs)

a) La structure générale d'un récepteur nucléaire. b) Les grandes fonctions associées à ces domaines.

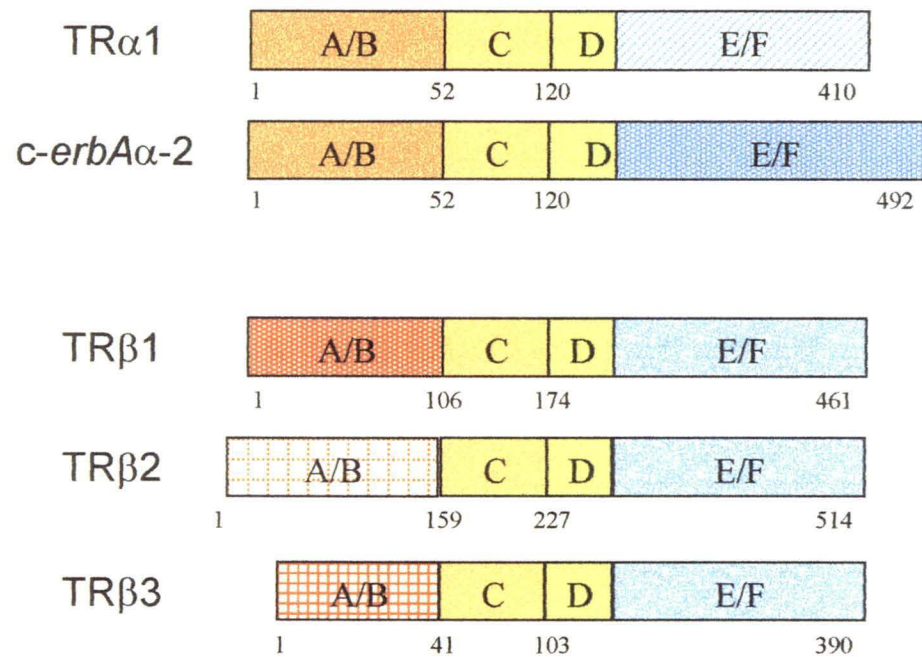


Figure 7

Représentation schématique des isoformes des TRs

Il existe 5 isoformes des TRs issues des 2 gènes c-erbA α et β .

associée avec divers éléments de la région promotrice proximale. La délétion des a.a. 21 à 30 de TR α de poulet diminue la capacité d'action de ce récepteur de 10 à 20 fois (Hadzie E et al., 1995; Tomura H et al., 1995). Néanmoins, il a été démontré que le domaine amino-terminal de TR β 1 n'est pas essentiel à l'activation de la transcription en présence de T₃ (Thompson CC et al., 1989). Sachant que les domaines amino-terminaux de ces deux isoformes sont divergents, on peut facilement penser que pour TR β 1, à défaut d'être fondamental à l'activation de la transcription en présence du ligand, le domaine A/B module la fonction du TR. D'autre part, la portion amino-terminale de TR β 2 contient deux régions distinctes de transactivation importantes pour les propriétés transcriptionnelles uniques de cette isoforme. Ces régions uniques sont distinctes et l'un de ces domaines comprend les acides aminés 89-116 de la portion amino-terminale du récepteur (Langlois MF et al., 1997). De plus, il existe au moins deux sites de phosphorylation de résidus sérines dans le domaine amino-terminal des TRs de poulet (Goldberg Y et al., 1988). Ces sites seraient la cible de kinases cytoplasmiques comme la protéine kinase C (Goldberg Y et al., 1988) et il a été démontré qu'une altération des séquences qui entourent ces sites de phosphorylation abolit l'interaction des TRs avec TFIIB et entrave donc la mise en place de la machinerie transcriptionnelle de base (Hadzic E et al., 1998). En plus de moduler l'activation transcriptionnelle, le domaine A/B serait impliqué dans la modulation de l'activation indépendante du ligand de TR β 2 (Hollenberg AN et al., 1996). Il semble que cette isoforme interagisse avec le corépresseur N-CoR par les hélices 1-3 et la région oméga du récepteur. C'est cette configuration particulière avec la région oméga qui empêche la liaison de

corépresseurs supplémentaires sur le complexe TR β 2-N-CoR (Hollenberg AN et al., 1996; Privalski et al., 1999 et 2000). Cette interaction est spécifique à cet isoforme. Finalement, il semble que le domaine A/B joue un rôle dans la reconnaissance de l'ADN du TR (Judelson et Privalsky, 1996).

En ce qui concerne le domaine C, le domaine de liaison à l'ADN, ce dernier est le domaine le plus conservé entre les différents récepteurs nucléaires. Cette structure de liaison à l'ADN a été très bien caractérisée pour le récepteur des glucocorticoïdes, de l'estrogène et des hormones thyroïdiennes (Luisi BF et al., 1991; Schwabe JW et al., 1993; Rastinejad F et al., 1995). Deux structures en doigt de zinc contenant toutes deux quatre cystéines et un atome de zinc confèrent la capacité au récepteur de reconnaître une séquence spécifique d'ADN espacée d'un nombre précis de nucléotides. Dans chacun de ces doigts de zinc, on retrouve deux régions particulières : la boîte P et la boîte D (Figure 8). La boîte P, située en carboxy-terminal du premier doigt de zinc, est responsable de la reconnaissance du demi-site consensus des TRs et de l'association spécifique de ces derniers avec des séquences hexamériques AGGTCA (Brent et al., 1989) de l'élément de réponse aux hormones (HRE) retrouvé sur l'ADN. Cette boîte s'insère donc dans le sillon majeur de l'ADN de façon très spécifique. En ce qui concerne la boîte D, située cette fois dans le second doigt de zinc, elle est impliquée dans la dimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires comme celui de l'acide 9-cis rétinolique (RXR). On retrouve aussi en C-terminal du domaine C deux autres boîtes : T et A. Leurs rôles sont mal connus à ce jour, mais ils participeraient respectivement à l'hétérodimérisation avec RXR et la stabilisation du TR sur l'ADN (Zhang et Lazar, 2000).

En plus de sa capacité à lier l'ADN, on découvre de plus en plus que le DBD du récepteur des hormones thyroïdiennes (C) possède la capacité de lier plusieurs corégulateurs, eux-mêmes susceptibles d'affecter l'activité transcriptionnelle. Plusieurs articles ont montré l'importance de ce domaine dans la liaison de certaines protéines impliquées dans la régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires. PCAF, une protéine capable d'acétyler les histones agit comme coactivateur de la fonction thyroïdienne (Blanco JC et al., 1998). PSF-A interagit avec le domaine de liaison à l'ADN de TR et RXR et médie, *via* Sin3A, une répression de leur activité transcriptionnelles (Mathur M. et al., 2001). HBO1, une nouvelle protéine identifiée par la méthode du double-hybride dans les levures, s'associe en partie au domaine C du récepteur des androgènes et diminue l'activité dépendante du ligand de ce dernier (Sharma M. et al., 2000). Ishizuka et al. ont montré qu'une protéine de la famille des ATPases, la protéine Tat-1 (Tat binding protein-1), interagit avec le domaine de liaison à l'ADN des TRs *in vivo* et *in vitro* pour potentialiser la transactivation dépendante du ligand de TR β 1 et TR α 1. De façon intéressante, l'action de cette protéine serait de plus spécifique pour les TRs et n'influencerait pas l'activité d'autres récepteurs nucléaires de la même famille comme RAR, RXR, PPAR γ ou ER (Ishizuka et al., 2001). GT198, une protéine interagissant avec le domaine C des récepteurs nucléaires, est un coactivateur significatif pour ER, TR β 1, AR, GR et PR (Lan K et al., 2001). Enfin, il a aussi été montré qu'une protéine liée au cytosquelette, HET/SAF-B, réduit l'activité transcriptionnelle en présence d'hormones pour le récepteur des œstrogènes (Oesterreich S. et al., 2000). Certains auteurs ont aussi montré que le domaine C des TRs serait impliqué dans la localisation nucléaire de ces

récepteurs. Baumann et al. ont montré que TR β 1 se situait principalement au noyau en présence ou en absence d'hormones thyroïdiennes (85-90%). Ces auteurs ont aussi fait la preuve qu'un mutant de TR β 1 dans son DBD amène une diminution légère de la translocation du récepteur au noyau en absence (76%) et en présence de T₃ (80%). Ceci suggère que même si le domaine D et son signal de localisation nucléaire (cf ci-dessous) sont cruciaux pour la localisation nucléaire, il apparaît que le DBD est aussi important pour la localisation subcellulaire indépendante du ligand de TR β 1.

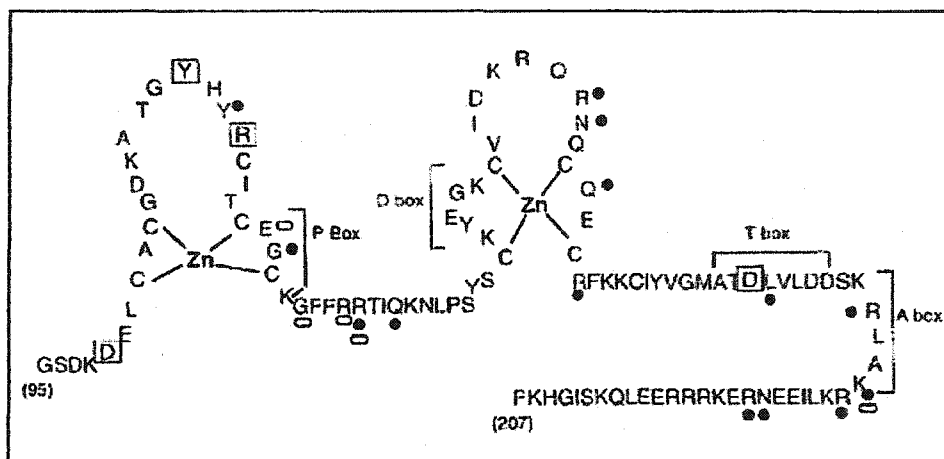
La région charnière (D) localisée entre le DBD et le domaine de liaison du ligand (LBD) est constituée d'une séquence riche en lysine très conservée qui serait associée au signal principal de localisation nucléaire (Evans et al., 1988). Suite à leur synthèse, les TRs doivent passer du cytoplasme au noyau par un mécanisme encore aujourd'hui inconnu. Selon la littérature, la majorité des TRs se retrouvent au noyau, liés de façon constitutive à l'ADN. Une étude récente a démontré à l'aide de protéines fluorescentes l'importance de la région charnière dans la translocation des TRs (Zhu et al., 1998). Des données montrent qu'il faut distinguer la région charnière réelle (fonctionnelle) des a.a. qui composent le domaine D. (Ribeiro RC et al., 2001). Ce domaine est aussi responsable de l'association de corépresseurs aux TRs (Horlein et al., 1995). Un article a aussi montré l'importance de la région charnière à la fois pour la reconnaissance des TREs, la liaison du ligand et la dimérisation du récepteur (Miyamoto et al., 2001).

Le domaine E/F est souvent considéré uniquement pour sa capacité de fixer le ligand. En effet, il est sous forme d'une poche constituée presque exclusivement de résidus hydrophobes arrangés principalement en hélices α lui permettant de fixer le ligand (Wagner et al., 1995). Néanmoins, outre la fixation du ligand, il est admis aujourd'hui que le domaine E/F du récepteur des hormones thyroïdiennes est impliqué dans la dimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires et l'association avec certains corégulateurs (Ding et al., 1998; La Douarin B et al., 1995; Vom Baur E et al., 1996). On peut diviser ce domaine en trois différentes sous-régions ayant chacune un rôle particulier dans la régulation de ce récepteur. D'abord, en N-terminal, on peut définir deux régions : τ_1 (τ_1), très probablement impliquée dans certaines interactions protéiques et la 9^{ème} heptade, importante pour l'interface hydrophobe dans l'hétérodimérisation (Yang et al., 1996). Il a été démontré que certaines mutations de la 9^{ème} heptade peuvent produire différentes réponses en ce qui a trait à la formation d'homo ou d'hétérodimères (Au-Fliegner M et al., 1993). Enfin, on sait que le domaine E/F du récepteur des hormones thyroïdiennes est impliqué dans la régulation de la transcription dépendante du ligand (Cavaillès V. et al., 1996). Le domaine E/F contient une troisième sous-région nommée AF-2. Cette fonction d'activation de la transcription est différente de la fonction transactivatrice AF-1. L'intégrité de cette région est absolument essentielle pour l'activation de la transcription dépendante du ligand et il existe une hypothèse selon laquelle elle se replie sous forme d'une hélice α amphipatique hautement conservée (Nagpal S et al., 1993; Barretino D et al., 1994; Tone et al., 1994). Grâce à la caractérisation détaillée de cette région, de nombreuses équipes ont isolé, par la technique du

double hybride, différents facteurs appelés coactivateurs capables de reconnaître AF-2 (Le Douarin B et al., 1995; Vom Baur E et al., 1996).

3.2.3 LIAISON A L'ADN ET DIMERISATION

La capacité de lier certaines séquences d'ADN de façon spécifique est essentielle à l'état fonctionnel des récepteurs nucléaires. Pour réguler l'expression de gènes cibles, ceux-ci doivent faire contact sur des éléments de réponse aux hormones (HRE) (Evans, 1998). La transcription de plusieurs gènes est régulée par les TRs. Certains comme l'hormone de croissance (Brent et al., 1989), l'enzyme malique (Desvergne et al., 1991) ou la Na⁺/K⁺ - ATPase (Gick et al., 1990) sont contrôlés de façon dite positive, c'est-à-dire que leur transcription est activée en présence d'hormones thyroïdiennes. D'autre part, on accorde de plus en plus d'importance aux gènes qui sont régulés négativement, comme ceux de l'axe hypothalamo-hypophysaire : la TRH (Hollenberg et al., 1995) et les sous-unités α et β de la TSH (Carr et al., 1994). Plus encore, un article récent montre que plusieurs autres gènes hépatiques importants sont régulés négativement par les hormones thyroïdiennes. Ceux-ci englobent des fonctions cellulaires importantes comme le métabolisme des acides gras (glucose-6-phosphatase), l'action de l'insuline (putative transcription factor of the insulin gene), la prolifération et la réplication cellulaire (Bcl-3), la synthèse de glycoprotéines (α -2,3-Sialyltransférase) et l'intégrité des protéines du cytosquelette (β -actine) (Yen et al., 2000).



Tiré de Rastinejad et al., 1995.

Figure 8

Structure du domaine de liaison à l'ADN du TR

Réprésentation schématique des deux doigts de zinc et des différentes régions du DBD.

La boîte P est responsable de la reconnaissance du demi-site consensus des TRs et de l'association spécifique de ces derniers avec des séquences hexamériques de l'élément de réponse aux hormones. La boîte D est impliquée dans la dimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires. La boîte T participe à l'hétérodimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires. La boîte A stabilise la liaison des TRs à l'ADN.

La séquence d'ADN consensus reconnue par les différents types de récepteurs nucléaires est composée d'hexamères nucléotidiques appelés demi-sites. Or, une liaison fonctionnelle et efficace du récepteur nucléaire sur le HRE requiert habituellement deux demi-sites arrangés selon une configuration particulière (Forman BM et al., 1990; Umesono K et al., 1988). D'abord, les récepteurs de classe I, dont fait partie le récepteur des glucocorticoïdes, lient l'ADN préférentiellement sous forme d'homodimères (deux molécules d'un même récepteur) sur des séquences palindromiques (PAL). D'autre part, les récepteurs de classe II, dont font partie le récepteur des hormones thyroïdiennes, le récepteur à l'acide rétinoïque, le récepteur de la vitamine D et le récepteur des prostaglandines, lient le HRE sous forme de monomère, d'homodimère ou d'hétérodimère (liaison entre deux récepteurs nucléaires différents). La formation d'hétérodimères a pour fonction d'augmenter l'affinité et la spécificité de liaison du complexe protéique à l'ADN (Mangelsdorf DJ et al., 1995; Glass CK et al., 1994; Hsu et al., 1995; Leng et al., 1994; Nelson et al., 1996; Rosen et al., 1992; Zhang et al., 1992). Les éléments de réponse positifs (pTRE, en ce qui concerne les hormones thyroïdiennes) pour cette classe sont les palindromes (PAL), les palindromes inversés (IP) et les répétitions directes (DR) (Glass et al., 1994). En ce qui concerne les éléments de réponse négatifs aux hormones thyroïdiennes (nTRE), l'état de leur configuration sur l'ADN est beaucoup moins connue. Les promoteurs des gènes de la TRH et de la TSH β contiennent des sites de fixation monomériques (Hollenberg et al., 1995; Bodenner et al., 1991). L'espacement entre les demi-sites des nTRE est peu connu, mais il semblerait que 11 paires de bases entre les sites consensus de TRH représenteraient une configuration optimale (Hollenberg et al., 1995; Kliewer SA et al., 1992;

Bugge TH et al., 1992). Le RXR est aussi important pour la régulation des gènes de l'axe hypothalamo-hypophysaire où il augmente sa régulation négative (Langlois et al., 1997; Safer et al., 1997; Laflamme et al., 2002).

C'est l'espacement entre les demi-sites, le nombre de demi-sites, les séquences qui les entourent et leur orientation qui vont déterminer la spécificité de liaison à un élément de réponse particulier. Il existe donc une grande variabilité de configurations possibles pour la régulation de la transcription par les TRs (Banialmad et al., 1990; Forman et al., 1992; Glass et al., 1988; Katz et al., 1994; Naar et al., 1991; Umesono et al., 1991; Kim et al., 1992; King et al., 1993). De façon classique, en présence d'hormones thyroïdiennes, les TRs s'hétérodimérisent avec le récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque (RXR) et lient l'ADN sur des répétitions directes (deux demi-sites de même orientation) espacées par quatre nucléotides (DR4) (Anderson et al., 1992; Miyamoto et al., 1993; Yen et al., 1993; Yen et Chin, 1994; Glass et al., 1989; Kliewer et al., 1992; Marks et al., 1992; Yen et al., 1992; Yu et al., 1991; Zhang et al., 1992). De plus, en présence d'hormones thyroïdiennes, il y a diminution de la formation d'homodimères. On note aussi que les TRs peuvent lier d'autres configurations de deux sites consensus telles les palindromes et les palindromes inversés (Glass et al., 1987; Ribeiro RC et al., 1994).

3.2.4 LES COREGULATEURS

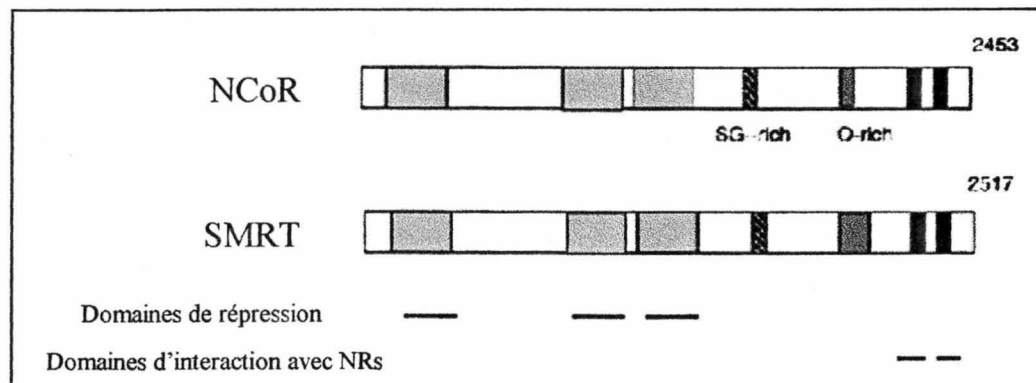
À titre de facteur de transcription, une des fonctions des TRs est de contrôler l'expression des gènes cibles (voir Figure 10). Plusieurs efforts ont été déployés pour comprendre les bases moléculaires du mécanisme d'action des récepteurs des hormones thyroïdiennes. Au contraire des récepteurs de type stéroïdiens, les TRs, aussi bien que RAR, RXR ou PPAR, lient de façon constitutive l'ADN en absence ou en présence de leur ligand (Zhang et al., 2000). En absence du ligand, le TR inhibe la transcription, alors qu'en présence de T_3 , il y a levée de la répression et recrutement de la machinerie transcriptionnelle. La capacité des TRs à réprimer certains gènes en absence d'hormone et de les activer en présence de leur ligand est cruciale pour la régulation de phénomènes biologiques. Or, un groupe de protéines dites corégulatrices assurent la régulation de ce double mécanisme. Certaines protéines dites corépressives et coactivatrices viennent moduler l'action des TRs sur les gènes cibles. Les corégulateurs sont situés à proximité des promoteurs des gènes cibles et vont affecter l'état des niveaux transcriptionnels. Les Figures 9 et 11 fournissent une liste partielle de quelques unes de ces protéines. Ce sont principalement des variations de la structure de la chromatine qui régulent la transcription. (Collingwood et al., 1999 ; Tsukiyama et Wu, 1997). L'ouverture de la chromatine (euchromatine) facilite le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base et l'activation de la transcription, alors qu'un état condensé de la chromatine (hétéchromatine) bloque l'accès de protéines essentielles dans la région du promoteur et réprime ainsi la transcription. C'est la balance entre l'acétylation et la déacétylation des histones qui définit l'état des interactions

entre l'ADN et les nucléosomes et, par conséquent, l'accessibilité des promoteurs des gènes cibles. La capacité de méthyliser l'ADN et l'activité ATPase sont aussi des mécanismes par lesquels les corégulateurs exercent leur influence sur la transcription (Glass et al., 2000). Des protéines impliquées dans la méthylation, « methyl-CpG-binding proteins », ont également été associées au complexe répresseur Sin3-HDACs (Nan, 1998), ce qui suggère des mécanismes de régulation supplémentaires dans l'action répressive des récepteurs nucléaires. Enfin, certains auteurs ont aussi montré que l'on peut potentialiser l'activité transcriptionnelle médiée par la T₃ de gènes cibles en augmentant l'état de phosphorylation d'une cellule (Jones et al., 1994 ; Lin et al., 1992). Davis et al. ont récemment montré que TRβ1 s'associe aux « mitogen-activated protein kinases » (MAPKs) pour moduler l'activité transcriptionnelle de ER et PPAR.

3.2.4.1 Corépresseurs

Plusieurs études ont montré que les TRs, en absence de T₃, sont capables de réprimer la transcription. En effet, il semble que les TRs inhibent la formation du complexe de préinitiation de la transcription par le biais d'interactions directes avec la TBP (TATA-box binding protein) ou le facteur de transcription TFIIB (Fondell JD et al., 1993; Baniahmad A et al., 1993). Il est aujourd'hui évident que des protéines nommées corépresseurs s'associent au complexe homo/hétérodimérique formé par TR et RXR et réprime la transcription en absence d'hormones thyroïdiennes par recrutement de protéines répressives ayant une activité histone déacétylase (HDAC) (Casanova J et al., 1994; Tong GX et al., 1996). Une grande découverte

fut le clonage de deux de ces corépresseurs soient: N-CoR/RIP13 (nuclear receptor corepressor) et SMRT/TRAC (silencing mediator for retinoid- and thyroid-hormone receptor) (Horlein AJ et al., 1995; Seol W et al., 1995; Chen JD et al., 1995; Sande S et al., 1996). Une série de mutations a permis de montrer qu'une région située dans le domaine D des TRs et des RARs, la boîte CoR, est requise pour l'interaction avec ces protéines répressives (Horlein AJ et al., 1995; Chen JD et al., 1995; Kurokawa R et al., 1995; Grignani F et al., 1998). N-CoR et SMRT possèdent une taille similaire ainsi que des domaines fonctionnels semblables (Figure 9). N-CoR et SMRT, entre autres, interagissent ensuite avec d'autres partenaires tels Sin3 ainsi que des protéines possédant une activité histone déacétylase (HDAC) (Nagy et al., 1997). La déacétylation des histones augmente l'affinité de l'ADN pour ces protéines et favorise un assemblage compact des nucléosomes, rendant la structure moins accessible aux protéines de la machinerie transcriptionnelle. Par le fait même, l'utilisation de trichostatine A, un inhibiteur d'HDAC, diminue fortement la répression effectuée par les récepteurs non liés (Wong et al., 1998). La famille des corépresseurs comprend aussi d'autres protéines comme PSF-A qui interagit aussi avec le domaine de liaison à l'ADN de TR et RXR *via* Sin3A pour médier une répression de leur activité transcriptionnelles (Mathur M. et al., 2001). TRUP (thyroid receptor uncoupling protein) (Burris TP et al., 1995) et SUN-CoR (small unique nuclear receptor corepressor) (Zamir et al., 1997 ; Alland et al., 1997 ; Heinzl et al., 1997; Nagy et al., 1997 ; Wong et al., 1998).



Modifié de Yen PM, 2001.

Figure 9

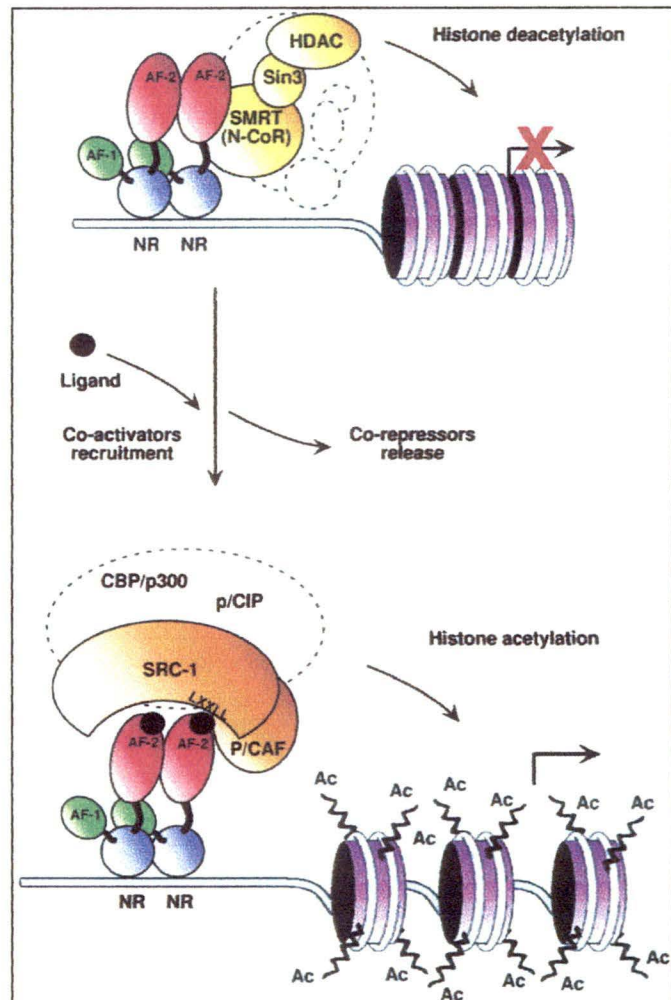
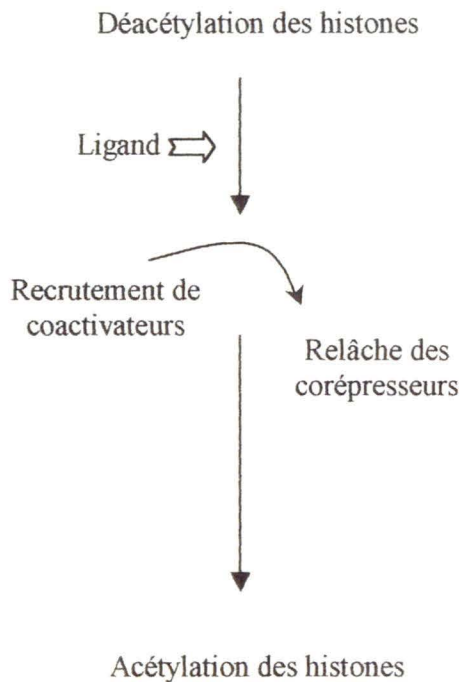
Les corépresseurs

NCoR et SMRT sont des corépresseurs importants pour les TRs. Ils contiennent des domaines impliqués dans la répression et d'autres dans les interactions avec les RNs.

3.2.4.2 Coactivateurs

Lorsque la T_3 lie son récepteur, l'hélice 12 du LBD se referme sur la poche hydrophobe contenant le ligand et le changement conformationnel engendré libère les corépresseurs (Baniahmad et al., 1992). Il y a alors recrutement de protéines coactivatrices qui ont des actions opposées à celles décrites pour les corépresseurs. Le criblage double-hybride dans la levure a été une méthode privilégiée pour identifier de nouveaux partenaires d'interaction aux récepteurs liés. Plusieurs membres de la famille de coactivateurs SRC (*steroid receptor coactivator*) ont été identifiés de cette façon (Leo et al., 2000). Ces coactivateurs possèdent une activité histone acétylase (HAT) intrinsèque qui, à l'opposé de l'activité HDAC, diminue l'affinité de l'ADN pour les histones et favorise une structure relâchée de la chromatine (Adams et al., 1993 ; Wolffe et Pruss, 1996). Celle-ci devient alors plus accessible aux diverses protéines impliquées dans la transcription. Des études ont montré l'interaction entre SRC-1 et le coactivateur CBP/p300, une protéine interagissant avec des facteurs de transcription, tels CREB et AP-1 (Chakravarti et al., 1996). Un autre coactivateur, PCAF, interagit à la fois avec les TRs, CBP/p300 et des protéines de la machinerie transcriptionnelle en plus de posséder une activité HAT intrinsèque. Toutes ces protéines forment un énorme complexe qui favorise l'activation de la transcription par les TRs. Ces protéines s'associent aux TRs principalement par le domaine AF-2 (Horwitz et al., 1996 ; McKenna et al., 1999 ; Shibata et al., 1997). Les données quant à l'importance de ce domaine nous proviennent d'études de mutagenèse effectuées sur divers récepteurs nucléaires. Il est en effet possible d'altérer l'activation de gènes

rapporteurs sans modifier la capacité du récepteur à lier l'hormone ou l'ADN (Danielian PS et al., 1992 ; Barettino D et al., 1994). De plus, rappelons que le DBD est aussi domaine d'importance pour la liaison de certains coactivateurs. Ishizuka et al. (2001) ont montré que Tat-1, une protéine de la famille des ATPases, interagit avec le domaine de liaison à l'ADN des TRs *in vivo* et *in vitro* pour potentialiser la transactivation dépendante du ligand de TR β 1 et TR α 1. GT198, une protéine interagissant avec le domaine C des récepteurs nucléaires, est un coactivateur significatif pour ER, TR β 1, AR, GR et PR (Lan K et al., 2001). Plusieurs autres coactivateurs existent à ce jour et la littérature dans ce champ d'intérêt est très abondante. La Figure 11 illustre d'autres protéines qui ont été isolées, comme TIF1 (*transcription intermediary factor 1*), TIF2 (*transcription intermediary factor 2*), GRIP-1 (*GR-interacting protein 1*), RIP-140 (*receptor-interacting protein of 140 Kda*) et TRAM-1 (*thyroid receptor activator molecule 1*) (Onate SA et al., 1995 ; Wang JC et al., 1998 ; Zhu et al., 1996 ; Lee SK et al., 1998 ; Kim HJ et al., 1998 ; Na SY et al., 1998 ; Onate SA et al., 1998 ; Takeshita A et al., 1996 ; Le Douarin B et al., 1995 ; Thenot S et al., 1997 ; Cavailles V et al., 1994 ; Lee CH et al., 1998 ; Chakravarti D et al., 1996 ; Jenster G et al., 1997 ; Blanco et al., 1998 ; Voegel et al., 1996). Il est à noter que SRC-1 fut le premier coactivateur identifié et qu'il constitue pour le complexe protéique d'activation une pierre angulaire. C'est lui qui recrute plusieurs autres protéines possédant elles-mêmes une activité HAT (Nolte RT et al., 1998 ; Lanz RB et al., 1999 ; Smith CL et al., 1996). Ces jeux d'acétylation et de déacétylation de la chromatine assurent donc un contrôle enzymatique de la transcription pour les TRs (Figure 10).



Tiré et traduit de Robyr et al., 2000.

Figure 10

Mécanisme d'action des TRs et mécanisme d'ouverture de la chromatine

Les TRs et les récepteurs nucléaires en général recrutent des corépresseurs en l'absence du ligand pour modifier l'activité de gènes cibles. En présence d'hormones, des coactivateurs viennent se lier aux RNs. On assiste alors à une fonction importante des corégulateurs, soit celle de remodeler la chromatine. Ceci s'effectue, entre autres, par une balance d'acétylation des histones.

Coacteurs	Noms alternatifs	Facteurs associés
RIP-140		RIP-160
TBP/TAF _{II} s		
SRC-1	hSRC-1 NCoA-1/mSRC-1 p160	TIF2/hSRC-2 p/CIP/mSRC-3 hSRC-3
Trip-1	Sug-1	Trips
TIF1 α		TIF1 β , γ
ARA-70		
TRAPs	DRIPs	
CBP		p300
p300		CBP
PCAF	hGCN5	
TIF2/hSRC-2	GRIP-1/mSRC-2 NCoA-2, p160	hSRC-1 mSRC-3/hSRC-3
TRIP230		
L7/SPA		
p/CIP/mSRC-3	ACTR/hSRC-3 RAC3/hSRC-3 AIB-1/hSRC TRAM-1/hSRC-3 p160, SRC-3	SRC-1 TIF2/hSRC-2 GRIP-1/mSRC-2

Tiré de McKenna J. et al., 1999.

Figure 11

Les coacteurs

SRC-1 et toute la famille des SRCs, Trip-1, PCAF et TRAPs sont des coacteurs pour les TRs et plusieurs autres récepteurs nucléaires.

VI. BUT DU PROJET

1. OBJECTIF GENERAL

L'objectif général du projet consistait à caractériser une protéine nommée 14C. Celle-ci avait été isolée par l'équipe du Dre Marie-France Langlois avant le début de mes études de maîtrise. Le cDNA avait alors été repêché à l'aide d'une portion de l'isoforme $\beta 2$ des TRs.

2. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

De façon plus spécifique, je me devais d'abord d'identifier le cDNA repêché et de déterminer sa localisation sur le génome humain. Dans un deuxième temps, je devais parvenir à reconfirmer et clarifier les interactions entre 14C et TR $\beta 2$. Ensuite, il me fallait caractériser l'expression du cDNA identifié dans différents tissus et compartiments cellulaires pour enfin effectuer des études transcriptionnelles à la recherche d'une relation fonctionnelle entre 14C et TR $\beta 2$.

VII MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.0 DOUBLE-HYBRIDE DANS LES LEVURES

(Cette étape fut réalisée avant le début de mes études de maîtrise et complétée à mon arrivée au laboratoire)

4.1 GENERALITES

Cette méthode permet de détecter des interactions protéiques spécifiques *in vivo* dans un système de levures. Elle s'appuie d'abord sur les propriétés du facteur de transcription GAL4 qui possède deux domaines distincts : le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'activation. Ceux-ci doivent être fusionnés ou encore rapprochés pour mener à l'activation de la transcription sur un élément de réponse GAL. Dans le système double-hybride, des vecteurs particuliers sont utilisés pour générer des constructions de ces domaines nous permettant de détecter des interactions protéiques. Une protéine dite d'appât peut être fusionnée au domaine de liaison à l'ADN et une librairie d'ADNc peut être annexée au domaine d'activation de GAL dans le but de détecter la présence d'interactions. S'il n'y a pas de rapprochement par une interaction significative entre les protéines, les domaines GAL ne seront pas rapprochés et la transcription ne sera pas activée. C'est la sélection de croissance des cultures par marqueurs nutritionnels et la mesure de l'activation du gène rapporteur LacZ

qui nous permettent ensuite de détecter les interactions protéiques significatives (voir Figure 12).

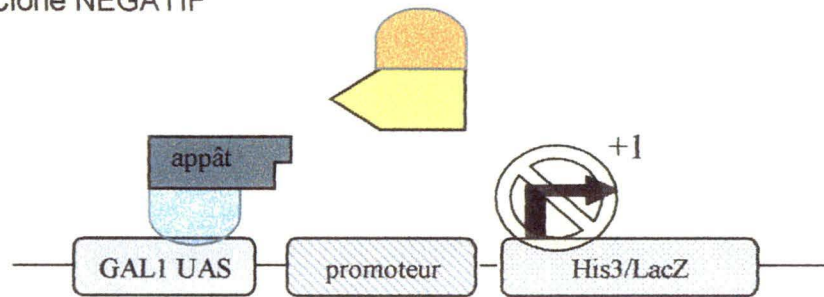
4.2 CONSTRUCTION DE L'APPAT CONTENANT LE DOMAINE DE LIAISON A L'ADN

Le plasmide pAS2-1 (8,4 kb) (Figure 13 A) a été digéré et linéarisé par les enzymes EcoRI et PstI. Une construction de TR β 2 a aussi été digérée par ces enzymes pour isoler une bande de 390 pb correspondant aux a.a. 89-220, soit le domaine de liaison à l'ADN de TR β 2 plus une partie amino-terminale (a.a. 89-116). Les produits de digestion ont été séparés sur gel d'agarose 1% 30 minutes à 100 volts. Le fragment de TR β 2 isolé de cette façon a été inséré en phase dans le vecteur pAS2-1 (marqueur nutritionnel : tryptophane).

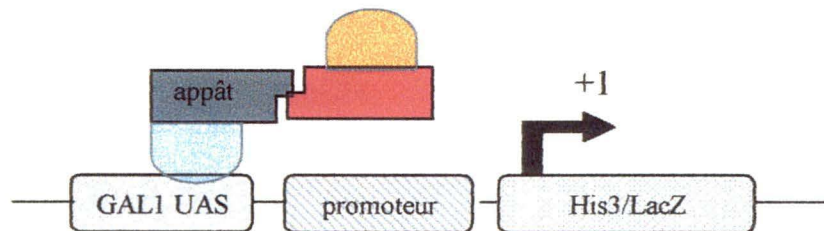
4.3 VECTEUR CONTENANT LA BANQUE D'ADNC ET LE DOMAINE D'ACTIVATION

Le plasmide pACT2 (marqueur nutritionnel : leucine) (Figure 13 B) contenant une librairie d'ADNc de cerveau fœtal humain provenant de fœtus entre 20 et 25 semaines (Clontech, Palo Alto, CA, #HL4028AH) a été transformé dans des bactéries de souche DH5 α (*Escherichia coli*), amplifié, puis purifié pour obtenir une qualité plasmidique adéquate.

Clone NÉGATIF



Clone POSITIF



- détection sur milieu His-
- essai colorimétrique β -galactosidase

Adapté de Hamann G. (Journée de sensibilisation à la recherche, 2001)

Figure 12

Le principe général du criblage double-hybride

Principe du double-hybride. S'il n'y a pas de rapprochement par une interaction significative entre les protéines, les domaines GAL ne seront pas rapprochés et la transcription ne sera pas activée. À l'inverse, en présence d'interaction, on peut observer une activation de la transcription.

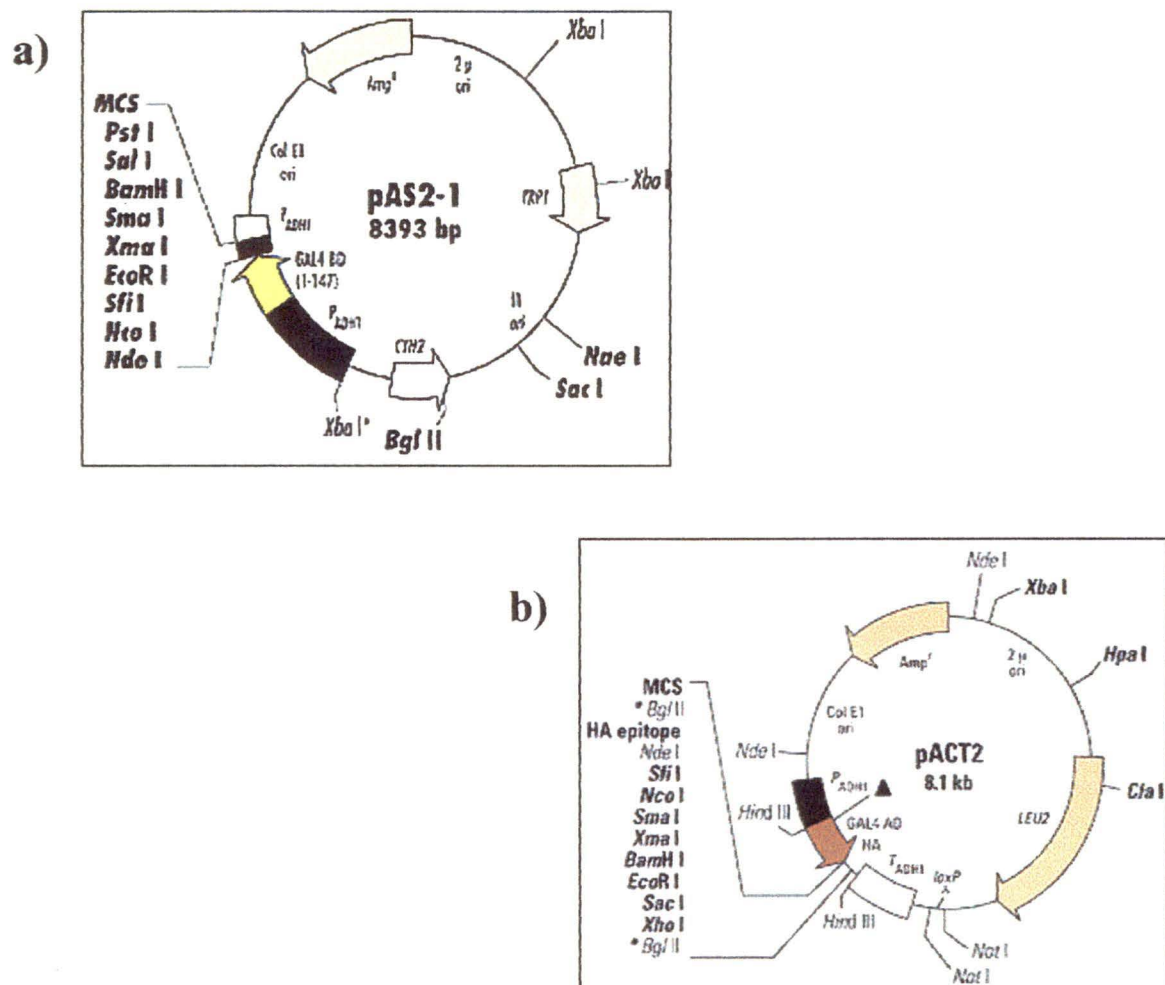


Figure 13

Vecteurs utilisés pour le criblage double-hybride

a) L'appât fut inséré dans le vecteur pAS21. b) La librairie fut introduite dans le vecteur pACT2.

4.4 ENSEMENCEMENT DES LEVURES

On étend une petite portion de la préparation de levures Y190 congelée dans le glycérol (25%) sur milieu YPD pétri agar (20 g/L DIFCO peptone, 10 g/L d'extrait de levures). Les levures sont ensuite incubées à 30°C jusqu'à ce que les colonies aient une taille d'environ 2 mm de diamètre. Les pétris peuvent être conservés à 4 °C pour 2 mois. Il est important de noter que cette souche de levure a été utilisée étant donné qu'elle favorisait, par un promoteur à l'histidine fuyant, les faux positifs plutôt que les faux négatifs.

4.5 TITRAGE DE LA BANQUE D'ADNC

Afin d'amplifier la librairie d'ADNc, on doit titrer celle-ci. On décongèle d'abord un aliquot de la librairie (Clontech, Palo Alto, CA) et on le place sur glace immédiatement. L'aliquot est mélangé en agitant doucement, puis on fait une première dilution 1:1 dans des tubes à microcentrifugation de 1,5 mL (10 µL de l'échantillon dans 10 µL de milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 µg/µL). On effectue une seconde dilution de la solution en prenant 1 µL et en la mettant dans 1 mL de bouillon LB (avec ampicilline). Le tout est agité doucement, ceci correspond à la solution A. Toujours dans un tube à microcentrifugation de 1,5 mL, on ajoute 1 µL de la solution A à 1 mL de bouillon LB (avec ampicilline). On mélange en vortexant doucement et ceci correspond à la solution B. On ajoute 1 µL de la dilution A à 50 µL de bouillon LB (avec ampicilline). Le tout est brassé en vortexant doucement et étendu en entier sur un pétri LB/ampicilline préchauffés à 30°C (bien étendre l'inoculum jusqu'à ce que le

liquide soit complètement absorbé). On prend 50 μ L et 100 μ L de la dilution B et on l'étend sur des pétris LB/ampicilline préchauffés. Les pétris sont laissés à la température de la pièce pour 15 à 20 minutes afin de permettre à l'inoculum liquide de bien pénétrer dans l'agar. Les pétris sont ensuite inversés et incubés à 30 °C pour 36 à 48 heures. Enfin, on compte les colonies pour en déterminer le titre (cfu/mL).

4.6 FORMULES POUR DETERMINER LA METHODE D'AMPLIFICATION

- 1- # de clones indépendants X 3 = nombre de colonies à cribler.
- 2- # de clones à "screener" / # de colonies par pétri (environ 35 000) = # de pétris.
- 3- # de clones à "screener" / titre de la librairie = μ ls de librairie à étendre.
- 4- Volume de milieu nécessaire pour étendre 150 μ l/pétri = # de pétri X 150 μ l.

On ajoute ensuite la quantité de μ ls de la banque à étendre au volume de milieu (LB/ampicilline, 100 μ g/ μ l) défini avec la formule 4.

4.7 AMPLIFICATION DE LA LIBRAIRIE PLASMIDIQUE

Après avoir déterminé le titre, la librairie est étendue (150 μ l de la préparation en 4.6 par pétris) sur des pétris YPD-agar pH 5,8. On étend suffisamment de cfu pour obtenir de 2 à 3 fois le nombre de clones indépendants de la librairie. L'inoculum est étendu sur l'agar et on le

laisse reposer 15 à 20 minutes à la température ambiante ou jusqu'à ce que le liquide soit absorbé. Le tout est inversé et incubé à 30-31°C pour 36 à 48 heures ou jusqu'à confluence. Environ 5 mL de LB-glycérol est ajouté à chacun des pétris et les colonies sont ensuite grattées dans un contenant adéquat. La culture est agitée vigoureusement puis, à partir de cette culture, une préparation de plasmide est faite en utilisant la méthode de méga-préparation de la compagnie QIAGEN.

4.8 TRANSFORMATION DES LEVURES

La méthode à l'acétate de lithium est utilisée pour transformer les levures Y190. Cette souche de levure a été préférée à la souche CG1945 étant donné qu'elle favorisait, par un promoteur à l'histidine fuyant, les faux positifs plutôt que les faux négatifs. Il était ainsi préférable d'effectuer des tests supplémentaires pour confirmer la positivité d'un clone, plutôt que de possiblement passer à côté de protéines intéressantes. Cette technique a été utilisée à plusieurs reprises, à grande échelle pour cribler la librairie d'ADNc et également pour reconfirmer la positivité des clones.

On inocule donc 1 mL de YPD avec 1 colonie de Y190 de 2 à 3 mm de diamètre. Le tout est vortexé pour disperser les agrégats. On transfère ensuite les levures dans 150 mL de YPD et la solution est incubée à 30°C durant 16 à 18 heures avec agitation (250 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne sa phase stationnaire ($DO_{600} \geq 1,5$). La culture est alors transférée dans 1L de YPD de façon à obtenir une DO_{600} d'environ 0,25, puis elle est une fois de plus incubée

à 30 °C durant 3 heures avec agitation (230 à 270 rpm) de façon à obtenir cette fois une DO_{600} d'environ 0,5. On place les cellules dans des tubes de 50 mL et on centrifuge à 1000 g durant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules resuspendues en vortexant dans un volume de 500 µL de TE stérile (0,01 M Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,5). On combine alors les cellules dans un contenant approprié pour centrifuger à 1000 X g 5 minutes à température ambiante. On décante le surnageant et les cellules sont resuspendues dans 8 mL de Te/LiAc stérile fraîchement préparé (0,1 M LiAC, pH 7,5 avec acétate dilué). Pendant ce temps, on prépare une solution de PEG/LiAC stérile (50% PEG 3350, 10X TE et 10X LiAC). On transforme ensuite chaque tube avec 0,2 mg à 1,0 mg de l'appât (DNA-BD), 0,1 mg à 0,5 mg de la librairie (AD) et 20 mg d'ADN de sperme de saumon. On ajoute 8 mL de levures compétentes et le tout est agité en vortexant. On ajoute 60 µL de PEG/LiAC et on agite de nouveau à haute vitesse. La solution de transformation est incubée à 30 °C, durant 30 minutes avec agitation à 200 rpm. On incorpore 7 µL de DMSO et on mélange cette fois doucement par inversions. On procède ensuite à un choc thermique à 42 °C durant 15 minutes, puis on refroidit rapidement la solution sur glace durant 1 à 2 minutes. On centrifuge les cellules à température ambiante (5 minutes à 1000 X g) et on jette le surnageant avant de resuspendre les cellules dans 10 µL de 1X TE. Enfin, 200 µL de la préparation est étendue sur milieu SD (pétris de 150 mm) approprié contenant les marqueurs nutritionnels adéquats (-His/-Leu/-Trp/+3AT (25 mM)) et le tout est incubé à 30°C jusqu'à ce que des colonies apparaissent. En principe, ces colonies contiennent l'appât et un clone interagissant de la librairie.

4.9 ESSAIS β -GALACTOSIDASE SUR COLONIES (FILTRE)

Afin d'identifier les clones contenant des interactions positives, nous utilisons cette méthode qui permet de visualiser, par l'apparition de colonies bleues, des interactions significatives.

Pour de meilleurs résultats, utiliser des colonies fraîches de 1 à 3 mm ayant poussé à 30°C durant 2 à 4 jours. Pour chacun des pétris de transformants, on trempe un filtre 410 dans 2,5 mL à 5 mL de tampon 2/X-gal (100 mL tampon Z (16,1 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,50 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pH 7.0, 0,75 g/L de KCl et 0,246 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,27 mL β -mercaptoéthanol et 1,67 mL de solution X-gal (dissout dans 20 mg/mL de DMF)) dans un pétri propre de 100 mm de diamètre. En utilisant des pinces, un filtre sec est ensuite placé sur la surface du pétri. On essuie doucement le filtre sur le pétri avec le rebord des pinces de façon à aider les colonies à coller au filtre. Des trous asymétriques sont percés au travers du filtre et de l'agar en 3 points de façon à orienter le filtre sur l'agar. Au moment où le filtre est bien imprégné des colonies de levures, on enlève le filtre de la surface d'agar avec des pinces et on le transfère (colonies vers le haut) dans un bain d'azote liquide. Ce dernier doit être submergé au plus 10 secondes. Une fois complètement congelé, on retire le filtre du liquide et on le laisse dégeler à température ambiante. Le filtre est alors placé vers le haut sur le filtre pré-trempé plus haut et le tout est incubé à 30 °C (ou température ambiante). On vérifie périodiquement l'apparition de colonies bleues qui démontrent une interaction significative.

4.10 EXTRACTION DE PLASMIDES A PARTIR DE LEVURES

À l'aide d'une tige, on échantillonne chacune des colonies apparaissant bleues sur le filtre. Ces colonies sont alors mises en culture à 30 °C dans 5 mL de YPD durant toute la nuit. La culture est centrifugée à 2000 rpm durant 5 minutes afin de recueillir les cellules, puis le surnageant est jeté. On resuspend à ce moment les cellules dans 0,5 mL de sorbitol (1 M), Na₂ EDTA (0,1 M, pH 7,5) et le tout est transféré dans un tube à microcentrifugation de 1,5 mL. On ajoute 0,02 mL d'une solution de lyticase et on incube à 37 °C durant 60 minutes. On centrifuge ensuite le mélange dans un tube à microcentrifugation de 1,5 mL durant 1 minute à 2000 rpm, puis on jette le surnageant avant de resuspendre les cellules dans 0,5 mL d'une solution de Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) ; EDTA (20 mM). On incorpore alors 0,05 mL de SDS 10 %, puis on agite vigoureusement. Le mélange est incubé à 65 °C durant 30 minutes afin d'inactiver l'enzyme. 0,2 mL d'acétate de potassium (5 M) est ajouté et le tout est mélangé doucement avant d'être placé sur glace durant 60 minutes. Dans un tube à microcentrifugation de 1,5 mL on centrifuge par la suite durant 5 minutes à 2000 rpm, puis on transfère le surnageant dans un nouveau tube à microcentrifugation de 1,5 mL. On y ajoute 0,2 mL d'isopropanol 100% (température ambiante) et on laisse reposer le tout à température ambiante durant 5 minutes. On centrifuge ensuite brièvement (10 secondes) et le surnageant est retiré afin de permettre au culot de sécher. On resuspend ce dernier dans 0,3 mL d'une solution de TE pH 7.4 (10 mM Tris-HCl ; 1 mM Na₂ EDTA). On incorpore 15 µL d'une

solution de RNase 1 mg/mL avant d'incuber le mélange à 37 °C durant 30 minutes. 0,03 mL d'acétate de sodium 3 M est ajouté et l'ADN est précipité à l'aide de 0,2 mL d'isopropanol 100%. On centrifuge brièvement afin d'obtenir un culot d'ADN, puis on jette doucement le surnageant pour permettre au culot de sécher. Le tout est resuspendu dans 0,2 mL de TE pH 7.4. On obtient l'ADN plasmidique voulu.

L'interaction fut ensuite reconfirmée dans les levures utilisant la méthode de transformation et les essais β -galactosidases (décrit plus haut), puis les clones furent envoyés pour séquençage chez ABI PRISM à Ottawa.

5.0 5'-RACE (RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS)

De façon générale, cette méthode permet l'identification de séquences nucléotidiques inconnues encodant la portion amino-terminale d'un ADNc. On utilise un extrait d'ARN provenant de tissus ou de cellules et on effectue une transcription inverse pour générer un ADN complémentaire (ADNc). On effectue ensuite une polyadénylation pour ensuite utiliser cette séquence introduite d'adénine et amplifier, à l'aide d'amorces qui se chevauchent, la portion 5' d'une séquence. Le tout est ensuite cloné dans un vecteur qui nous permettra

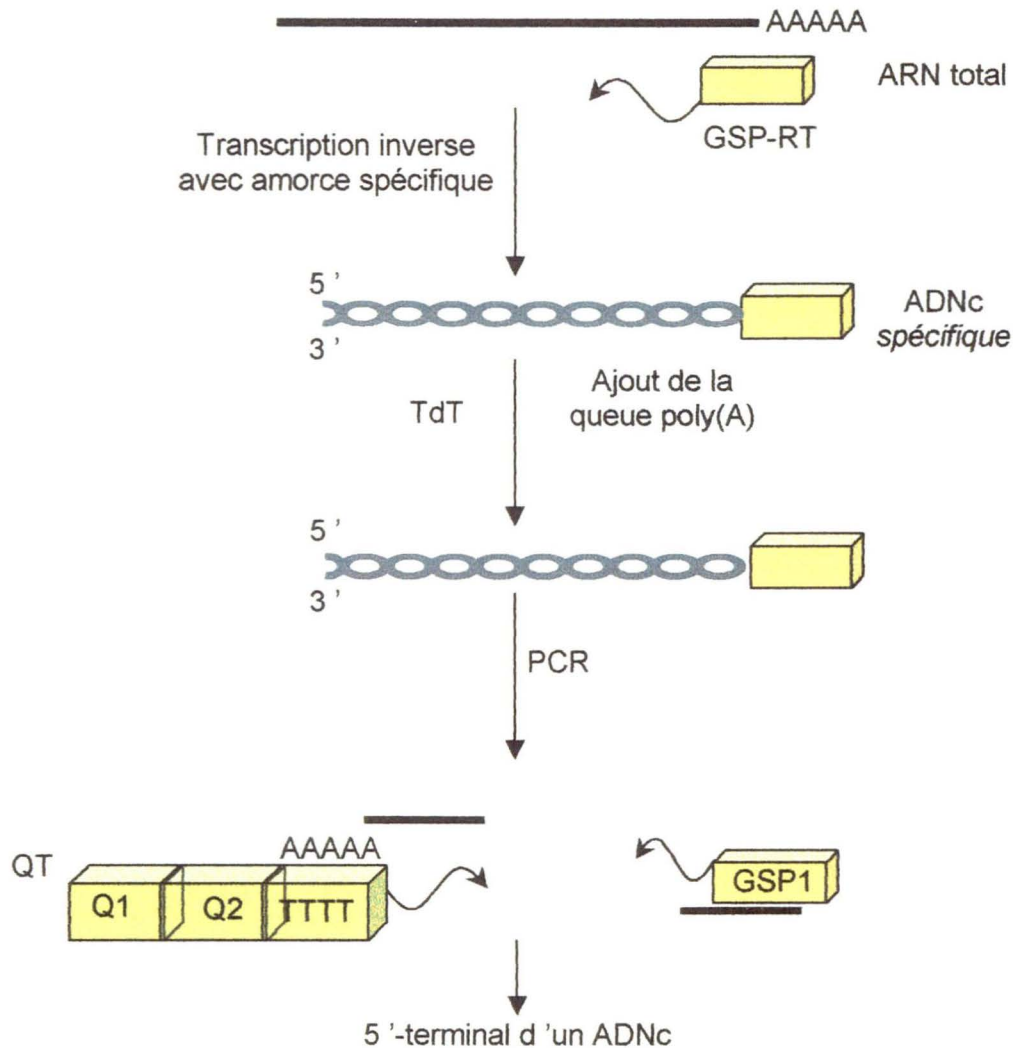


Figure 14

Principe général du 5'-RACE

On utilise un extrait d'ARN et on effectue une transcription inverse pour générer un ADN complémentaire (ADNc). On effectue ensuite une polyadénylation pour utiliser cette séquence introduite d'adénine et amplifier, à l'aide d'amorces qui se chevauchent, la portion 5' d'une séquence. GSP-RT : amorce utilisée pour la RT ; TdT : Terminal deoxynucleotidyl transferase ; QT, Q1, Q2 et GSP1 : amorces utilisées pour l'amplification spécifique de l'ADNc.

ensuite de séquencer une portion inconnue d'un ADNc (Figure 14) (Graham et al., 2000). Ainsi, après avoir extrait l'ARN total de cellules Hela (méthode TRIzol décrite plus loin), on effectue la transcription inverse selon le protocole décrit plus loin en utilisant une amorce pour notre clone (ici l'amorce utilisée est la suivante : Bas-14C-PEGFPPSG5 ; se référer à la section PCR). Une polyadénylation de ADNc obtenu est ensuite effectuée afin de générer un site de reconnaissance pour les étapes de PCR subséquentes. À l'aide d'un chevauchement partiel des amorces (voir ci-bas) et de conditions de PCR de plus en plus spécifiques, la portion 5' inconnue de ADNc est amplifiée en utilisant comme site de départ le brin polyadénylé. De cette façon, la technique permet une spécificité de l'amplification. Selon des méthodes de clonage standardisées, les bandes amplifiées de façon efficace sont ensuite clonées dans un vecteur permettant un séquençage facile et rapide du produit obtenu.

Amorces utilisés :

GSP-RT : 5'-tgatgactcaacttcagcaacatt-3'

Qt : 5'-ccagtgagcagcgtgacgaggagaattcccggaagctttttttttttt-3'

Q0 : 5'-ccagtgagcagagtgagc-3'

Q1 : 5'-gaattcccggaagctt-3'

GSP-1 : 5'-aacttcagcaacattatgtctggc-3'

GSP-2 : 5'-aacattatgtctggcttcttaaggatcctgcagaagctt

6.0 ESSAI D'INTERACTION UTILISANT LES PROTÉINES GST

Il existe plusieurs techniques pour étudier les interactions protéiques. La méthode par « GST pull-down » est celle que nous avons privilégiée car elle ne nécessite pas d'anticorps et est rapide. Une protéine d'intérêt est fusionnée avec la glutathione-S-transférase (GST) et purifiée à l'aide de la glutathione couplée à une bille de sépharose. Une deuxième protéine est marquée au ^{35}S dans du lysat de réticulocyte de lapin, qui contient les protéines nécessaires à la transcription et à la traduction. Si les deux protéines sont misent en contact et qu'elles interagissent, nous observerons sur un autoradiogramme, après lavages, centrifugation, et suite à une migration sur un gel dénaturant, une bande à la hauteur de la protéine marquée (Figure 15).

6.1 PRODUCTION DE PROTEINES DE FUSION GST

On décongèle une petite quantité de bactéries DH5 α transformées avec la construction plasmidique TR β 2-pGEX-4T-2 (construction plasmidique contenant le récepteur TR β 2 fusionné en phase avec la GST) et on l'étale délicatement par stries sur un pétri LB-ampicilline (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). On laisse sécher le tout avant d'incuber le pétri pour la nuit à 37 °C. Le lendemain matin, on pique une colonie isolée et on l'inocule dans 5 mL de bouillon LB-ampicilline (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). La culture bactérienne est incubée pour la nuit avec agitation à 37 °C. On prend ensuite 200 μL du bouillon de culture et on l'ajoute à 5 mL de bouillon LB-

ampicilline (50 µg/µL) frais. On incube de nouveau la culture durant 4 heures à 37°C avec agitation pour obtenir une D.O.₆₀₀ entre 0,6 et 0,8. On induit ensuite la culture avec 0,05 mM d'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) et on agite celle-ci à température ambiante pour la nuit. Une fois induite, la culture est centrifugée à 2000 rpm, 10 minutes, puis le culot bactérien est resuspendu dans 1 mL de solution de lyse GST (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,02% Na Azide, 1% Triton X-100) contenant des inhibiteurs de protéases. Il est à noter que toutes les étapes suivantes devront être réalisées sur glace ou à 4 °C pour éviter la dégradation protéique. On transfère l'homogénat dans un tube à microcentrifugation de 1,5 mL. Sur glace, on brise les membranes bactériennes doucement (force 2, 2 fois, 10 à 15 secondes) à l'aide d'un sonicateur (Sonic Dismembrator 60, Fisher Scientific, USA). Le tout est ensuite centrifugé à 2000 rpm, 5 minutes à 4 °C. On transfère le surnageant dans une nouvelle série de tubes à microcentrifugation de 1,5 mL et on y ajoute 50 µL d'une solution contenant 50 % de billes de sépharose couplées à la glutathione afin de purifier la protéine GST. On incube la préparation pour la nuit à 4 °C en maintenant une légère agitation. Le lendemain, on centrifuge celle-ci à 1000 rpm, 30 secondes à 4 °C, ce qui permet la récupération des billes de sépharose liées à la GST. On effectue un premier lavage des billes en utilisant 1 mL de solution de lyse fraîchement préparée. On procède à quatre lavages subséquents utilisant cette fois 500 µL de solution de lyse. Les protéines produites sont ensuite migrées à 120 volts durant 30 minutes sur gel SDS-PAGE dénaturant de 10% afin d'en vérifier la qualité, le reste étant gardé sur bille de sépharose pour utilisation ultérieure.

1) Production de la protéine *in vitro*.

2) Production de la protéine de fusion GST.

3) Essai d'interaction avec la glutathione (G) couplée à des billes de sépharose (S).

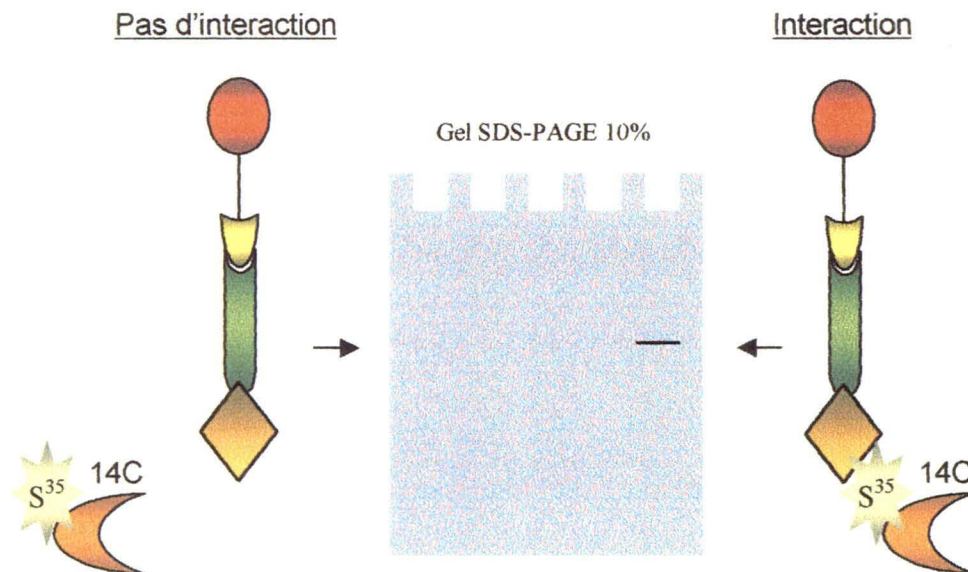
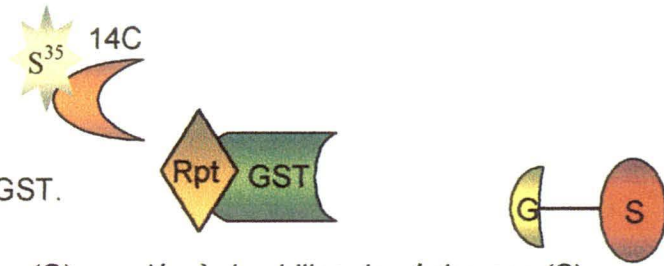


Figure 15

Principe de l'essai de précipitation avec protéine GST

Une protéine fusionnée avec la glutathione-S-transférase (GST) et purifiée à l'aide de la glutathione couplée à une bille de sépharose. Une deuxième protéine est marquée au ^{35}S . Les deux protéines sont mises en contact et, si elles interagissent, nous observons une bande sur un autoradiogramme.

6.2 PROTEINES MARQUEES AU ^{35}S

6.2.1. Description de la construction 14C-pKCR2

Le plasmide pKCR2 (4,1 kb) a été digéré et linéarisé par l'enzyme BamHI. Le produit fut ensuite déphosphorylé 15 minutes à 37°C avec une phosphatase alcaline (Pharmacia, Baie d'Urfé, QC). À partir de la construction 14C-pAS2-1, 14C a été amplifié selon une méthode PCR standard (voir ci-bas) en utilisant les amorces suivantes qui introduisent un site de restriction BamHI:

-Haut-14C: 5'-TCTCGGATCCATCCATGCCATGAAGGAATTGA-3'

-Bas-14C: 5'-CTCTGGATCCGTACTGCTAGTCTGGCAA-3'

GGATCC (site de restriction BamHI)

Le fragment amplifié a été migré sur gel d'agarose 1 %, 30 minutes à 100 volts. L'ADN a été purifié à l'aide de l'ensemble « QIAEX II » (Qiagen, Mississauga, ON). L'ADN a ensuite été digéré en ses extrémités par l'enzyme BamHI. Tous les produits de digestion (vecteur et fragment amplifié) ont été migrés sur gel d'agarose 1%, 30 minutes à 100 volts afin d'évaluer les proportions de ligation. Dans un rapport de 1 pour 10, 14C a été inséré en phase dans le vecteur pKCR2, puis ligué avec une T4 DNA-ligase (Invitrogen, Burlington, ON). Le clonage fut ensuite vérifié par digestion enzymatique et séquençage adéquats.

6.2.2. Transcription et traduction *in vitro*

De façon standard, pour un volume total de 50 μL , on met dans un tube à microcentrifugation de 1,5 mL 1 μg de la construction plasmidique 14C-pKCR2 en présence de 25 μL de lysat de réticulocytes de lapin TNT (Promega), 2 μL du tampon de réaction, 1 μL de T7 TNT polymérase (USB, Cleveland, Ohio), 1 μL d'un mélange d'acides aminés sans méthionine, 1 μL d'inhibiteurs de la dégradation d'ARN (40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) et 4 μL de méthionine marquée au ^{35}S 10 mCi/mL (NEN, St-Laurent, Qc). L'activité spécifique de la protéine produite fut supérieur à 10^5 cpm/ μg d'ADN tel que recommandé. On incube la préparation à 30°C pour une période variant entre 1 et 2 heures et on fait migrer le tout à 120 volts durant 30 minutes sur un gel SDS-PAGE 10%. Une fois migrés, les produits protéiques sont visualisés sur un film à haute résolution (BioMax, Kodak) par autoradiographie après une exposition de 24 heures à température ambiante.

6.3 «CO-SEDIMENTATION»

Pour chacune des réactions, on met environ 15 μL de billes GST-TR β 2 dans un tube à microcentrifugation de 1,5 mL et on y ajoute 200 μL d'une solution tampon HEMG (40 mM d'Hepes pH 7,8, 40 mM de KCl, 0,2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100, 10% glycérol, 1,5 mM DTT, 1 pastille d'inhibiteurs de protéases /10 mL de solution et 10 mg/mL de BSA). Pour chacune des réactions, 5 μL (la quantité de protéines mises dans chacune des

réactions doit être équivalente) de protéine marquée est incorporée à la préparation. Le tout est ensuite agité doucement 2 heures à température ambiante. Les échantillons sont par la suite centrifugés à 1000 rpm durant 45 secondes, puis lavés de la même façon 5 fois avec 500 µL d'HEMG (sans inhibiteur de protéases et de BSA). On centrifuge une dernière fois et on jette le maximum de surnageant. La D.O.₅₀₀ des échantillons est mesurée et celle-ci doit être inférieure à 0,005. 20 µL de chacune des préparations est migrée à 200 volts, 3 heures sur un grand gel SDS-PAGE 10 %. Cela fait, les produits protéiques sont visualisés sur un film à haute résolution (BioMax, Kodak) par autoradiographie après une exposition de 24 heures à température ambiante (voir Figure 15). L'apparition d'une bande nous permet de déceler une interaction entre la protéine fusionnée à la GST et celle marquée au ³⁵S. Il est à noter que lorsque plusieurs protéines sont comparées dans un même essai, le dosage se fait par comparaison de la densité des bandes, par un appareil analyseur d'image, après coloration au Bleu de Coomassie. Pour chacun des essais d'interaction, un contrôle négatif utilisant la protéine GST seule devra être migré en présence de la protéine marquée radioactivement.

7.0 METHODES D'EXTRACTION DE L'ARN

7.1 EXTRACTION DE L'ARN TOTAL (TISSUS DE RAT) (METHODE1)

Afin de clarifier l'expression tissulaire de 14C, les tissus de rats (Long Evans, adultes, 180-200 g) ont été recueillis grâce aux études faites par le laboratoire du Dre Nicole Gallo-

Payet sur la glande surrénale. Les tissus recueillis furent mis immédiatement sur glace afin de minimiser les risques de dégradation de l'ARN.

L'extraction d'ARN est faite à l'aide de la méthode TRIzol® Reagent (Gibco BRL, Burlington Ont.) suivant le protocole décrit par la compagnie GIBCO. Étant donné la susceptibilité de l'ARN à la dégradation par les RNases, il est important que les étapes subséquentes soient faites en utilisant des solutions et des contenants libres de RNases. Donc, tout le matériel est préalablement stérilisé et manipulé avec des gants neufs sur une paillasse dédiée à cette fin. Une fois prélevé, 50 mg de tissus est homogénéisé (trituration à l'aide d'une pipette) dans 1 ml de TRIzol. Après 5 minutes d'incubation à la température pièce, le tissu homogénéisé est transféré dans des tubes à microcentrifugation de 1,5 ml et vortexé. Ensuite, on ajoute 200 µl de chloroforme par ml de TRIzol, on vortexe 10 minutes et laisse reposer 10 minutes à température pièce. Chacun des échantillons est ensuite centrifugé à 12 000 g, 15 minutes à 4°C. Suivant la centrifugation, on recueille la phase aqueuse (supérieure) qui est transférée dans un nouveau tube auquel on ajoute 500 µl de chloroforme. On mélange le tout au vortex pendant 10 secondes et on laisse reposer 10 minutes à la température de la pièce. L'échantillon est par la suite centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est transféré dans un autre tube à microcentrifugation de 1,5 mL. Ensuite, on ajoute à ce surnageant 500 µl d'isopropanol. Cette étape permet de précipiter l'ARN. Après une incubation de 10 minutes à la température de la pièce, l'échantillon est centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C. On enlève le surnageant et on lave le culot avec 1 ml d'éthanol

75 %. On centrifuge à 7500 g, 5 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et on sèche le culot d'ARN sous la hotte chimique pendant 5 à 10 minutes. L'ARN est resuspendu dans 20 µl d'eau DEPC (diethylpyrocarbonate 0,01 % v/v) sur glace. Les échantillons sont conservés à -80 °C.

7.2 EXTRACTION DE L'ARN TOTAL (TISSUS DE RAT) (METHODE 2)

Puisque nous avons des difficultés à isoler l'ARN de chacun des tissus de rat avec la méthode décrite plus haut de façon simple et rapide et que ceci occasionnait des problèmes de dégradation et de pureté de l'ARN, une deuxième méthode d'extraction a été employée. Cette méthode permet de simplifier certaines étapes critiques d'exposition de l'ARN à l'environnement et aux RNases et ainsi d'optimiser son extraction des tissus. C'est la méthode «RNAqueous-4PCR» de la compagnie Ambion (Texas, USA). Les précautions prises ci-haut concernant la stérilisation et l'usage de gants s'applique aussi bien à cette méthode. On utilise ici entre 0,5 et 0,75 mg de tissus de rat. Dans un tube à centrifugation de 1,5 ml, on ajoute 150 µl de solution de lyse (cette solution contient du guanidium de thiocyanate, un agent chaotropique qui lyse les cellules et inactive rapidement les ribonucléases) et on homogénise tout de suite en triturant à l'aide d'une pipette. On ajoute 150 µl de la solution d'éthanol 64% et on agite en inversant le tube à quelques reprises. De façon parallèle, on insère une cartouche filtre dans un tube collecteur libre de RNase. Ensuite, on ajoute délicatement la solution de tissus homogénéisés sur le filtre et on centrifuge 1 minute à 12

000 rpm. Le liquide filtré est enlevé et le tube collecteur est réutilisé pour les étapes suivantes. On lave la cartouche filtre avec 700 µl de la solution de lavage 1 et 2 fois avec 500 µl de la solution de lavage 2 (concentration plus faible en détergent). Le filtre est ensuite enlevé et installé sur un nouveau tube collecteur propre (ce dernier servira à recueillir l'ARN). On élue l'ARN avec 80 µl de la solution d'élution pré-chauffée à 100 °C. L'ARN élué est recueilli par une première centrifugation de 30 secondes à 12 000 rpm. On élue une seconde fois en utilisant 60 µl de la solution d'élution. Les échantillons sont conservés à -80 °C.

7.2.1 Traitement à la DNase et son inactivation

Afin de purifier l'ARN recueilli, on traite le produit de l'extraction précédente à la DNase (Pharmacia, Biotech), une enzyme permettant de dégrader l'ADN. Aux 140 µl d'ARN recueilli, on ajoute 14 µl du tampon DNase I (10X) et 1 µl de DNase I. Le tout est incubé 30 minutes à 37 °C. La DNase est ensuite inactivée en ajoutant 14 µl de la solution d'inactivation (20mM EGTA pH 8.0). On agite doucement et laisse reposer 2 minutes à la température pièce avant d'utiliser.

7.2.2 Concentration de l'ARN

Cette étape permet de concentrer l'ARN et de fournir une plus grande quantité d'ARN par volume aux réactions de transcription inverse subséquentes. On ajoute donc 12 µl d'acétate d'ammonium (5 M) et 1,2 µl d'acrylamide linéaire (71 g/moles) à la solution d'ARN recueillie à l'étape précédente (l'acrylamide linéaire est utilisé pour augmenter le rendement de récupération). Ensuite, 240 µl d'éthanol 100 % est ajouté et le tout est bien mélangé en inversant le tube pour permettre à l'alcool de précipiter de façon efficace l'ARN. On centrifuge 15 minutes à 12 000 g et enlève par la suite le surnageant en aspirant doucement à l'aide d'une pipette. L'ARN est enfin resuspendu dans 20 µl d'eau DEPC.

7.3 DOSAGE DE L'ARN ET EVALUATION DE SA PURETE

Le dosage et l'évaluation de la pureté de l'ARN a été fait par spectrophotométrie. La densité optique est d'abord mesurée à 260 et 280 nm. La concentration de l'ARN est évaluée par dosage spectrophotométrique à la longueur d'onde 260 nm où une unité de densité optique équivaut à 40 mg d'ARN/ml. La pureté de l'ARN est évaluée en faisant le rapport de la D.O. à 260 nm sur la D.O. à 280 nm. Un rapport entre 1,5 et 2 indique que l'ARN est d'une pureté satisfaisante.

8.0 RT-PCR

L'amplification de 14C a été initialement produite suite à une transcription inverse (RT) sur l'ARN de cellules de tissus de rat. Cette méthode nous permet de clarifier l'expression de 14C dans différents tissus de rats en amplifiant ensuite par PCR l'ADNc produit.

8.1 TRANSCRIPTION INVERSE

De façon standard, nous avons utilisé 1 µg d'ARN de tissus de rat par réaction. On ajoute ensuite 1 µl d'oligo-(T) (0,5 µg/µl) et le volume est complété jusqu'à 10,5 µl avec de l'eau DEPC (0,01 % v/v). Le tout est chauffé 10 minutes à 70 °C. Durant ce temps, on prépare une deuxième solution contenant 4 µl de tampon (M-MLV RT 5X buffer, Promega), 2 µl de DTT (0,1 M), 2 µl de dNTP (10 mM), 0,5 µl d'inhibiteur de RNAses (5 U/µl, Pharmacia), et 1 µl de transcriptase inverse (M-MuLV 200 u/µl, Promega). Aux 10,5 µl préparés, on ajoute 9,5 µl de la solution 2 et on incube le produit final 60 minutes à 42 °C, puis 10 minutes à 70 °C. L'ADNc produit peut être conservé à 4 °C.

8.2 REACTIONS EN CHAÎNE DE LA POLYMERASE (PCR)

Ces réactions furent utilisées à différentes étapes lors de mon projet de recherche. L'ADNc de 14C, entres autres, fut amplifié par cette méthode afin d'introduire différents enzymes de restriction nécessaires aux constructions produites et d'obtenir une quantité d'ADN suffisante.

Chacune des réactions de PCR d'un volume de 50 µl est composée de 1 µl (0,2 µM) de chaque amorce décrite et synthétisées par la compagnie SIGMA GENOSYS, 5 µl de tampon PCR 10X (100 mM hydroxyméthyl-aminométhane (tris)-cl pH 9,0, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl), 1 µl de dNTP 10 mM (200 µM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,1 à 0,25 µg d'ADN ou de produit de RT et 0,5 µl de Taq polymérase (5 unités/µl, en solution dans 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5mM dithiothreitol (DTT), 0,1 mM EDTA et 50% glycérol ; Amersham Pharmacia, USA). Les réactions de PCR ont été faites sur un appareil Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) dans des conditions d'amplification de 5 minutes à 94 °C suivies de 35 cycles de 60 secondes à 94 °C (dénaturation), 60 secondes 55 °C (hybridation des amorces) et 30 secondes à 72 °C (élongation), puis d'une incubation finale de 5 minutes à 72 °C. Le produit de la réaction de PCR a été placé sur un gel d'agarose de 1,0 % (avec bromure d'éthidium) et la migration a été effectuée à 100 volts pendant 30 minutes. Les bandes attendues varient selon le type de PCR, mais la bande 14C se situe à 565 pbs.

Pour la méthode de RT-PCR, on effectue ensuite un PCR selon la méthode décrite plus haut en utilisant entre 0,1 et 0,25 µg d'ADNc et les amorces suivantes :

A) Amorces pour 14C (nucléotides -16 à 544 du clone initial):

-Haut-14C-pEGFP5G5 : 5'-TCTCGAATTCAGAAGAAATCCATGCCATGAAGGAA-3'

-Bas-14C-PEGFP5G5 : 5'-CTCTGGATCCCTCCGGCCATCACCTGTTACC-3'

Produit attendu : 560pb

B) Amorces pour 14C (nucléotides -9 à 381 du clone initial):

-Haut-14C: 5'-TCTCGGATCCATCCATGCCATGAAGGAATTGA-3'

-Bas-14C: 5'-CTCTGGATCCGTACTGCTAGTCTGGCAA-3'

Produit attendu : 390 pb

Pour chacun des RT-PCR on amplifie de façon parallèle une enzyme : l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) qui constitue un contrôle positif nous permettant d'évaluer l'efficacité de la réaction. La bande attendue pour HPRT est de 370 pb.

- HPRT-up : 5'-CCTGCTGGATTACATTAAAGCACTG-3'

- HPRT-down: 5'-CCTGAAGTACTCATTATAGCTAAGG-3'

Les produits de RT-PCR ont été placés sur gel d'agarose 1% (avec bromure d'éthidium) et la migration a été effectuée à 100 volts pendant 30 minutes.

9.0 DOT BLOT

Il était intéressant dans la caractérisation initiale de 14C de localiser les sites d'expression de 14C, ce qui aurait pu nous donner des indices quant à la fonction physiologique du complexe TR β 2-14C. Pour ce faire, nous avons utilisé une membrane commerciale contenant l'ARN de nombreux tissus et lignées cellulaires humaines (CLONTECH, #HL4028AH). Nous avons hybridé cette membrane avec une sonde composée d'une portion de 14C (Figure 16).

9.1 PREPARATION DE LA SONDE

De façon générale, cette étape permet l'incorporation de nucléotides marqués radioactivement à la portion de 14C utilisée pour l'hybridation. Ainsi, dans un volume total de 34 μ L, on met dans un tube à microcentrifugation de 1,5 mL entre 25 ng et 50 ng d'ADN (digestion de 14C par BamHI dans 14C-pKCR2), puis on dénature ce dernier en chauffant de 2 à 3 minutes le tube dans l'eau bouillante (95 °C à 100 °C). On place ensuite rapidement l'ADN dénaturé sur glace durant 2 minutes. Après avoir centrifugé brièvement, on ajoute 10 μ L d'une solution tampon aqueuse (dATP, dTTP, dGTP et plusieurs combinaisons de fragments ribonucléiques)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	whole brain	cerebellum, left	substantia nigra	heart	esophagus	colon, transverse	kidney	lung	liver	leukemia, HL-60	fetal brain	yeast total RNA
B	cerebral cortex	cerebellum, right	nucleus accumbens	aorta	stomach	colon, descending	skeletal muscle	placenta	pancreas	HeLa S3	fetal heart	yeast tRNA
C	frontal lobe	corpus callosum	thalamus	atrium, left	duodenum	rectum	spleen	bladder	adrenal gland	leukemia, K-562	fetal kidney	<i>E. coli</i> rRNA
D	parietal lobe	amygdala	pituitary gland	atrium, right	jejunum		thymus	uterus	thyroid gland	leukemia, MOLT-4	fetal liver	<i>E. coli</i> DNA
E	occipital lobe	caudate nucleus	spinal cord	ventricle, left	ileum		peripheral blood leukocyte	prostate	salivary gland	Burkitt's lymphoma, Raji	fetal spleen	poly (A)
F	temporal lobe	hippocampus		ventricle, right	ileocecum		lymph node	testis	mammary gland	Burkitt's lymphoma, Daudi	fetal thymus	human C _β -1 DNA
C	p. g.* of cerebral cortex	medulla oblongata		inter-ventricular septum	appendix		bone marrow	ovary		colorectal adenocarcinoma, SW480	fetal lung	human DNA 100 ng
H	pons	putamen		apex of the heart	colon, ascending		trachea			lung carcinoma, A549		human DNA 500 ng

Figure 16

La membrane commerciale utilisée pour le dot blot (Clontech #HL4028AH)

Tissus et lignées cellulaires utilisés pour le dot blot. Fœtus humains (25-25 semaines).

et 5 μL d' $[\alpha\text{-}^{32}]\text{dCTP}$ (3000Ci/mmol). Le volume est amené à 49 μL en complétant avec de l'eau distillée. On incorpore ensuite 1 μL de «Klenow Fragment» (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), on mélange et la préparation est incubée à 37 °C pour une période de 45 minutes. La réaction est arrêtée en ajoutant 5 μL d'EDTA (0,2M). L'activité spécifique de la sonde marquée doit être supérieure à 10⁹ cpm/ μg pour permettre une hybridation optimale. Le calcul du % d'incorporation ((cpm sonde / cpm total)X 100) nous permet de déterminer l'activité spécifique d'une sonde donnée en cpm/ μg .

9.2 PRE-HYBRIDATION

Afin de réduire les risques d'hybridation non-spécifique, la membrane commerciale est pré-hybridée. On réchauffe 15 mL de la solution ExpressHyb (fournie par CLONTECH, USA) à 55 °C et on y ajoute 1,5 mg d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé dans l'eau bouillante (95 °C) durant 5 minutes. La préparation est bien mélangée. On place la membrane commerciale (ARNm de plusieurs tissus humains provenant de fœtus de 20 à 25 semaines, de l'adulte et de différentes lignées cellulaires) (Clontech, Palo Alto, CA, #HL4028AH) (Figure 16) dans une bouteille de verre à hybridation et on ajoute dans celle-ci 10 mL de la solution préparée ci-haut. La membrane est incubée à 65 °C dans un four à hybridation rotatif durant 30 minutes.

9.3 HYBRIDATION

On prend l'ADNc marqué au [α -³²]dCTP (section 10.1) et on y ajoute 30 μ g d'ADN C_{ot}-1 (Roche Diagnostics, Laval, Qc), 150 μ g d'ADN de sperme de saumon et 50 μ L de 20X SSC. Le tout est chauffé dans de l'eau bouillante (95°C à 100°C) 5 minutes, puis à 68 °C, 30 minutes. On incorpore ensuite cette préparation aux 5 mL restants de solution préparée lors de l'étape de pré-hybridation. Il faut s'assurer à cette étape que les deux solutions sont bien mélangées. La solution de pré-hybridation est retirée de la bouteille et jetée, puis remplacée par la solution d'hybridation. On procède à l'hybridation en incubant la membrane dans le four à hybridation à 65 °C toute la nuit (12-16 h) avec une agitation modérée (rotation).

9.4 LAVAGES ET EXPOSITION DE LA MEMBRANE

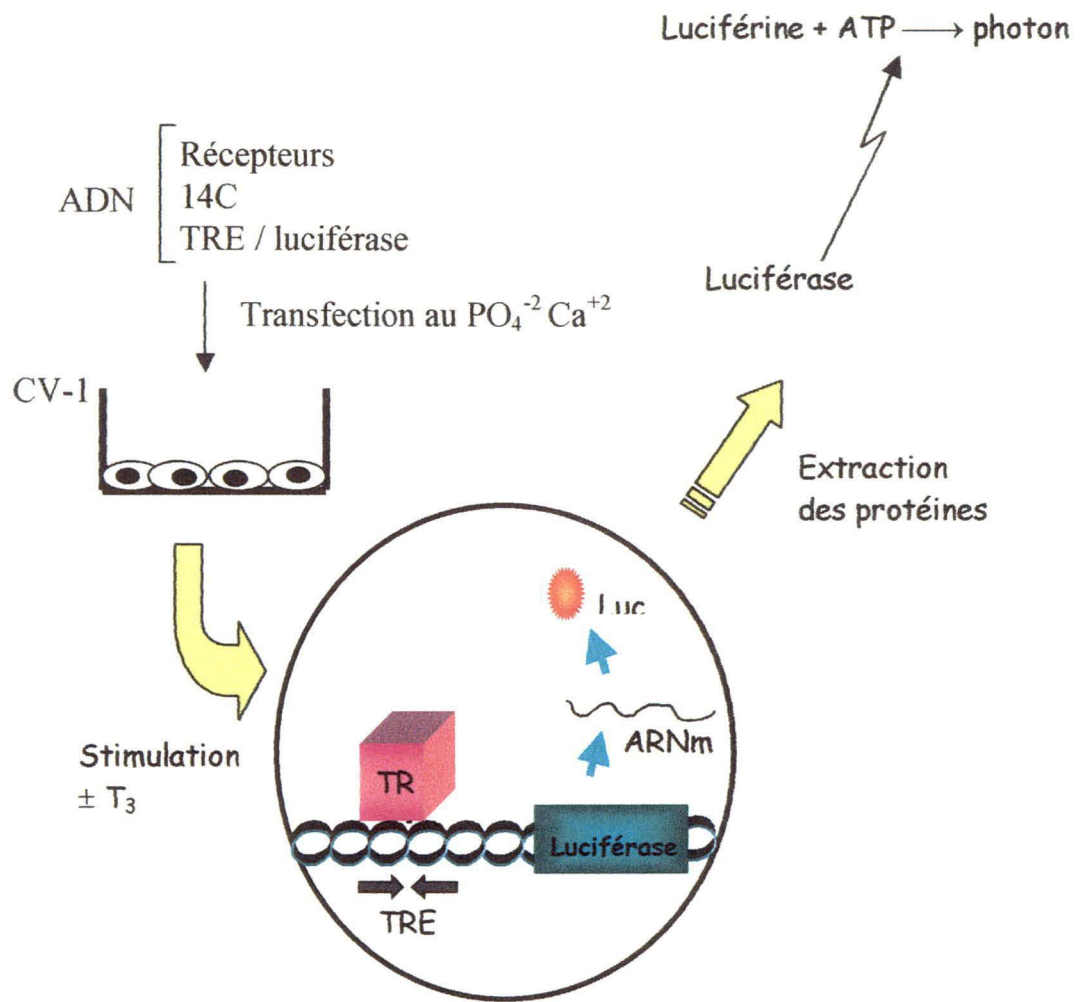
La membrane est lavée en jetant d'abord la solution d'hybridation pour la remplacer par 100 mL de la solution de lavage 1 (2X SSC, 1 % SDS) préalablement réchauffée à 65°C. Le tout est de nouveau incubé dans le four à hybridation à 65 °C durant 20 minutes avec une agitation continue et modérée (rotation). On rince ainsi la membrane 4 fois avant de passer à la deuxième série de lavages qui consiste à retirer la solution de lavage 1 pour procéder à deux lavages supplémentaires en ajoutant cette fois 100 mL de la solution 2 (0,1X SSC, 0,5 % SDS) pré-chauffée à 65°C. Ces étapes de lavages s'effectuent en incubant la membrane à 65°C, 20 minutes, tout en maintenant une agitation continue et modérée (rotations). À l'aide

de pinces, on retire la membrane du contenant à hybridation et on enveloppe celle-ci immédiatement d'une pellicule de plastique scellée. Le tout est placé dans une cassette étanche et on visualise le résultat de l'hybridation sur un film à haute résolution (BioMax, Kodak) par autoradiographie après une exposition de 24h à une semaine à -80°C .

10.0 CULTURES CELLULAIRES ET TRANSFECTIONS

Cette méthode est utilisée afin de permettre d'observer de façon expérimentale le rôle de 14C sur l'activité transcriptionnelle médiée par TR β 2 et des TRs en général.

Une lignée cellulaire de type CV-1 (carcinome rénal de singe vert d'Afrique, ATCC) est donc maintenue dans un milieu Dulbecco modifié (Invitrogen, Burlington, ON) enrichi avec de la L-glutamine, du sérum bovin fœtal (10%), de la pénicilline et de la streptomycine (Gibco BRL), à 37°C , 5 % CO_2 . À sous-confluence, la culture cellulaire est transfectée, de façon transitoire, dans des plateaux de 6 puits en utilisant la méthode de précipité au phosphate de calcium (« Mammalian Cell Transfection Kit » ; Speciality Media, Phillipsburg, NJ). Pour chacune des expériences, on utilise 10 μg du vecteur exprimant un gène rapporteur couplé à la luciférase (TRETk, TRH) (Chatterjee V.K. et al., 1991; Messier N et al., 2001), 500 ng du vecteur codant pour l'une ou l'autre des différentes isoformes du récepteur des hormones thyroïdiennes (TR α 1, TR β 1, TR β 2), ou 500 ng du vecteur seul (contrôle pKCR2). Seize heures après la transfection, le milieu de culture dans lequel baignent les cellules est retiré, les cellules lavées au PBS, et le



Modifié de Messier, N. (Séminaire biochimie 2000)

Figure 17

Principe de transfection et d'essai luciférase.

Les ADNs sont transfectés à l'aide d'un précipité de $\text{PO}_4^{-2} \text{Ca}^{+2}$. Les TRs activent la transcription de luciférase en présence ou en absence de T_3 . La transcription sera dosée au luminomètre après lyse cellulaire et la quantité de photons produite sera directement proportionnelle à l'activité transcriptionnelle du promoteur étudié.

milieu est remplacé par un autre dépourvu en hormones par du charbon activé et une résine échangeuse d'anions, puis 10 nM de T_3 est ajouté au milieu lorsqu'indiqué. Le tout est incubé à 37°C environ quarante heures. Les cellules sont ensuite lysées, puis on mesure de façon indirecte l'activité transcriptionnelle du système en mesurant l'activité luciférase. Le dosage de l'activité luciférase est réalisé sur un luminomètre (Berthold Lumat). Lors de l'essai, 150µl de luciférine (750µM) (Molecular Probes, Eugene, OR) et 150µL de solution d'essai (25mM Gly-Gly, 15mM $MgSO_4$, 4mM EGTA, 15mM KPO_4 -dibasique, 3mM DTT, 60mM ATP) sont injectés automatiquement à 200µL du lysat cellulaire (Figure 17). Les données préliminaires recueillies proviennent d'au moins 2 expériences différentes et les résultats sont indiqués en ne montrant pas l'erreur standard sur la mesure qui est très approximative étant donné le nombre d'expériences réalisées.

11.0 PROTEINES FLUORESCENTES

11.1 CONTRUCTION DES VECTEURS D'EXPRESSION

11.1.1 TRβ2 dans pDsRed1-N1

Le plasmide pDsRed1-N1 (4,7 kb) (Figure 18 A) a été digéré et linéarisé par les enzymes EcoRI et BamHI. À partir de la construction TRβ2-pKCR2, TRβ2 a été amplifiée selon une méthode PCR standard en utilisant les amorces suivantes :

1- 3' TRb2-pDsRpAS21 : 5'-CTCTGAATTCCCTCGAACACTT-3'

2- 5'TRb2 (A) : 5'-TCTCGGATCCAAAATGAACTAC-3'

Le fragment amplifié (510 pbs) a été migré sur gel d'agarose 1 %, 30 minutes à 100 volts. Purifié, l'ADN a ensuite été digéré en ses extrémités de façon séquentielle par les enzymes EcoRI et BamHI. Tous les produits de digestion (vecteur et fragment amplifié) ont été migrés sur gel d'agarose 1 %, 15 minutes à 100 volts afin d'évaluer les proportions de ligation. Dans un rapport de 1 pour 5, TRβ2 a été inséré en phase dans le vecteur pDsRed1-N1 (excitation maximale de 558 nM et émission maximale de 583). La construction a été confirmée par digestions enzymatiques et le séquençage est discuté dans la section résultats.

11.1.2 14C dans pEGFP-C1

À partir de la construction 14C-pKCR2, 14C a été isolée en digérant le vecteur avec les enzymes de restriction EcoRI et BamHI. Le plasmide pEGFP-C1 (4,7 kb) (Figure 18 B) a aussi été digéré et linéarisé par les enzymes EcoRI et BamHI. Les produits de digestion (vecteur et 14C) ont été migrés sur gel d'agarose 1%, 15 minutes à 100 volts afin d'évaluer les proportions de ligation. Dans un rapport de 1 pour 12, 14C a été insérée en phase dans le vecteur pEGFP-C1 (excitation entre 480-495 nM et émission entre 515-555). La construction a été confirmée par digestions enzymatiques et le séquençage est discuté dans la section résultats.

11.2 Transfection (lipofectamine)

La lipofectamine est une formulation de liposomes du cation polyanionique de trifluoroacétate de propanaminium (DOSPA). Cette formulation lipidique permet une transfection par incorporation membranaire des produits transfectés. L'utilisation de liposomes permet l'incorporation cellulaire de plus gros fragments et donne moins d'artéfacts cellulaires que le phosphate de calcium.

Ainsi, dans un plateau de 6 puits, placer $1-3 \times 10^5$ cellules CV-1 par puits dans 2 mL de milieu modifié (Invitrogen, Burlington, ON) enrichi avec de la L-glutamine, du sérum bovin foetal (10 %), de la pénicilline et de la streptomycine (Gibco BRL). Incuber la culture cellulaire à 37°C dans un incubateur avec 5% CO₂ 18 à 24 heures pour atteindre 50 % à 80 % de confluence cellulaire. Dans des tubes stériles de 12 x 55 mm, préparer ensuite les solutions suivantes :

Solution A : 1-2 µg d'ADN dans 100 µL de milieu modifié Dulbecco sans sérum enrichi et traité aux antibiotiques tel que ci-haut.

Solution B : Pour chacune des transfections, diluer 2-25 μ L de Lipofectamine (GibcoBRL) dans 100 μ L de milieu modifié (Invitrogen, Burlington, ON) sans sérum, enrichi et traité aux antibiotiques tel que ci-haut.

On combine ensuite les deux solutions préparées ci-haut, on mélange doucement pour incuber ensuite à la température ambiante de 15 à 45 minutes. Cette incubation permet aux complexes ADN-liposomes de bien se former. Durant ce temps, on rince les puits de culture avec 2 mL de milieu modifié (Invitrogen, Burlington, ON) sans sérum, supplémenté et traité aux antibiotiques. Pour chacune des transfections, ajouter ensuite 800 μ L de milieu sans sérum aux tubes contenant les complexes liposomaux. Agiter doucement, puis recouvrir les cultures cellulaires rincées avec la solution diluée. Incuber le tout dans un incubateur avec du CO₂ (5 %) 24 heures à 37 °C. On rince au PBS et on remplace ensuite le milieu avec du milieu frais avec sérum. Le tout est visualisé ensuite en microscopie de fluorescence avec le filtre approprié : bleu pour une excitation entre 370-390 nM et une émission entre 435-485 ; vert pour une excitation entre 480-495 nM et une émission entre 515-555 ; rouge pour une excitation maximale de 558 nM et une émission maximale de 583 (Chroma films). L'analyse des images s'effectue *via* Cell Robotics WorkStation, 24 à 48 heures après la transfection.

11.3 Marquage des noyaux au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)

Le DAPI (Molecular Probes, USA) fluorescent bleu est un marqueur préférentiel de l'ADN double-brin. Il semble s'associer avec les regroupements AT dans le sillon mineur de l'ADN. Le protocole suivant sert au marquage des noyaux de cellules adhérentes pour fin de visualisation en microscopie fluorescente (voir ci-haut pour le type de filtre utilisé).

Diluer la solution de DAPI originale à 300 nM dans du PBS. Ajouter 300 μ L de ce DAPI dilué aux cellules en culture en s'assurant que celles-ci sont recouvertes de façon uniforme. Incuber le tout 5 minutes et rincer les puits de culture cellulaire 5 fois avec du PBS. Visualiser ensuite les cellules en microscopie de fluorescence avec un filtre approprié (voir ci-haut).

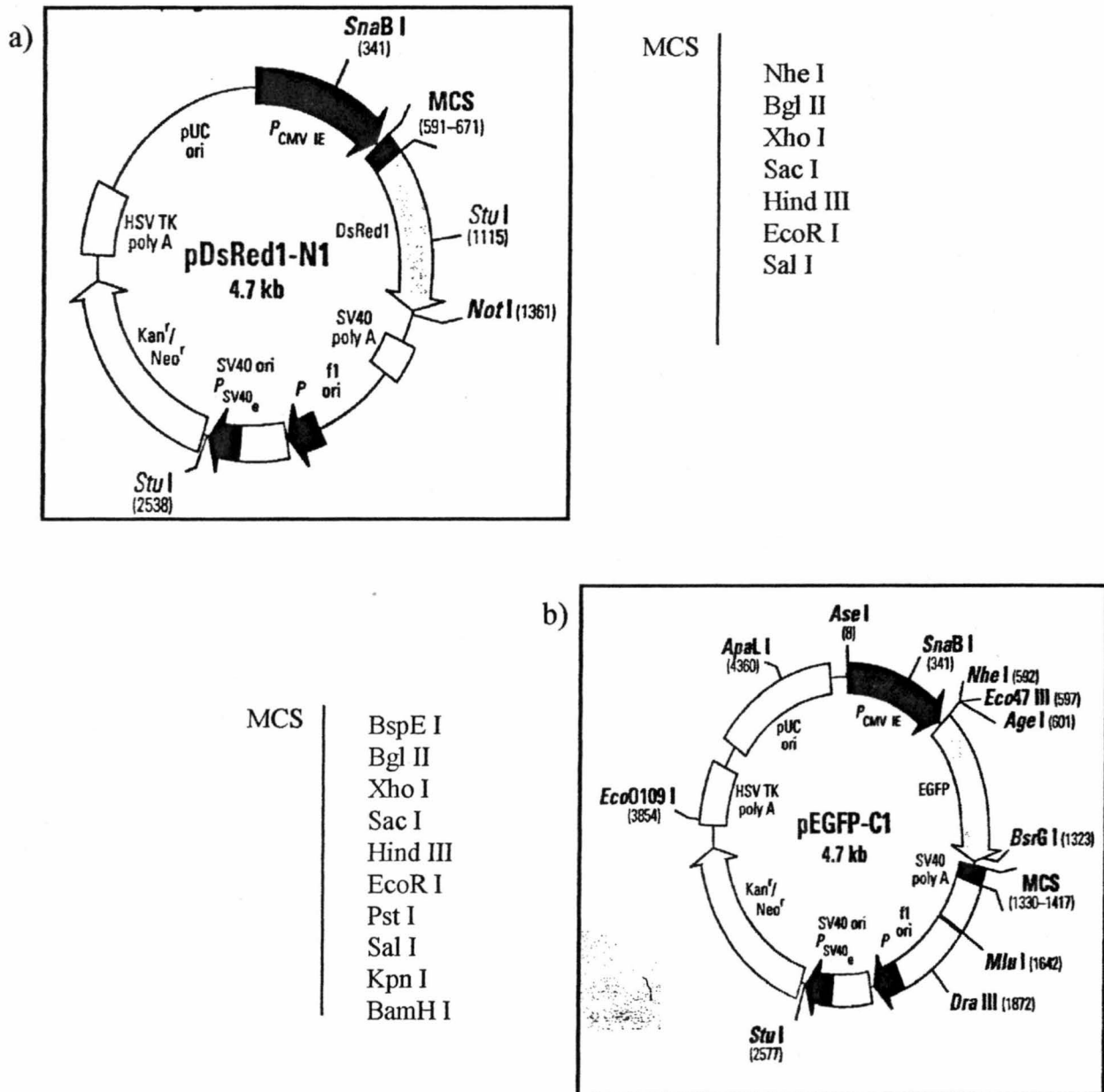


Figure 18

(CLONTECH, Palo Alto, USA)

Vecteurs fluorescents

a) pDsRed1-N1 (CLONTECH, Catalogue #6921-1) b) pEGFP-C1 (CLONTECH, Catalogue #6084-1). Le site de clonage multiple (MCS) est détaillé pour chaque vecteur.

VIII. RESULTATS

12.0 IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE PROTEINE : 14C

Utilisant la méthode du double-hybride dans les levures, nous avons identifié un clone positif suggérant une interaction significative avec la construction décrite ci-haut du récepteur des hormones thyroïdiennes de type $\beta 2$ (acides aminés 89-220). Suite au séquençage du clone positif par une méthode classique. Nous avons identifié un ADNc de 565 pbs (Figure 19) codant pour une protéine d'au moins 184 acides aminés en phase avec le vecteur de clonage pACT2. Nous nommerons ce clone 14C.

Utilisant ensuite la séquence du cDNA identifié, nous avons comparé 14C avec la banque de séquences disponibles (UniGene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/protest.cgi>). Il est apparu que la protéine identifiée par la méthode du double hybride ne correspondait à aucune autre protéine déjà répertoriée. On peut observer, d'après les résultats de la recherche obtenue, que la séquence protéique de 14C ne possède aucun homologue connu. Certaines homologues mineures sont observées, mais aucune d'elle n'est significative. On peut noter que le cDNA RIKEN de *Mus musculus*, un type de rat, correspond en partie au cDNA de 14C. 14C ne contient aussi aucun domaine particulier si ce n'est un domaine hélicoïdal (a.a. 51 à 78), structure protéique quaternaire très fréquente et non-spécifique (Annexe A).

Dans le but de caractériser notre cDNA et de déterminer sa localisation particulière chez l'humain, nous avons comparé ce dernier avec les séquences disponibles du génome humain. Il apparaît que 14C se situe sur le long bras du chromosome 5, plus particulièrement en position 5q23.1 (UniGene Nucleotide, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.cgi>). La séquence possède une forte homologie avec la séquence humaine et semble très localisée au niveau de cette région. Nous avons ainsi identifié la localisation d'un nouveau gène pour 14C (Figure 20).

La presque totalité du nouveau cDNA identifié se situe sur cette région très particulière du chromosome 5. Trois exons subissent un épissage pour compléter 99% de 14C, le cDNA identifié par double-hybride. Seule la première méthionine est manquante (Figure 21). Ceci pose donc un problème et deux hypothèses ont été proposées et seront élaborées dans la discussion. On peut déjà discuter et supposer que cette méthionine n'est peut-être pas celle du départ de la protéine.

13.0 5'-RACE

Une étape importante fut celle de tenter d'identifier la séquence 5' manquante de 14C à l'aide de la technique du 5'-RACE. Cette méthode comporte plusieurs étapes et est très complexe. Il n'existe aucun moyen efficace de bien vérifier l'efficacité de chacune des étapes du protocole. On évalue seulement la finalité de la réaction en mesurant le produit final. Trois tentatives ont été effectuées dans le but d'obtenir un produit final de PCR, sans succès. Un

premier réflexe fut d'abord de vérifier la qualité de l'ARN de départ, puis, d'optimiser les conditions de son extraction. Je me suis donc assuré de travailler dans un environnement libre de RNAses et j'ai stérilisé tous les instruments utilisés. Les étapes reliées à l'extraction de l'ARN étaient faites sur glace et rapidement pour minimiser la dégradation. L'état de dégradation de l'ARN fut vérifié sur gel d'agarose afin de permettre un suivi des étapes du 5'-RACE. Une bonne qualité d'ARN nous permettait de poursuivre. Malgré plusieurs précautions lors des étapes du 5'-RACE, je n'obtenais toujours pas de bande significative au PCR. J'ai donc, tel que décrit dans la section 7.2, changé de protocole d'extraction d'ARN en utilisant la méthode «RNAqueous-4PCR» de la compagnie Ambion, ceci, sans succès. J'ai ensuite vérifié la qualité de l'ARN en migrant le tout sur un gel d'agarose 1 %, 20 minutes à 120 volts pour constater par spectrophotométrie une bande correspondant à la sous-unité ribosomale 28S, signe d'une bonne qualité d'ARN. De plus, il n'y avait aucun signe de dégradation de l'ARN utilisé (trainée). J'ai donc tenté d'optimiser mes conditions d'amplification par PCR. En abaissant ainsi la température d'hybridation des amorces à 50 °C et en permettant au delà de deux minutes d'élongation par cycle, j'ai diminué la spécificité de mes conditions de PCR pour augmenter leur sensibilité dans le but d'obtenir au moins un produit de PCR final. Ces changements de protocole ont néanmoins échoués. À mon départ du laboratoire, je n'avais toujours pas réussi à optimiser le protocole et nous nous étions alors donné comme objectif à court terme de reviser en totalité le protocole pour éventuellement modifier les amorces utilisées pour le PCR et s'assurer de la qualité de l'ARN et des produits d'amplification tout au long du processus.

14.0 CONFIRMATION DE L'INTERACTION ENTRE 14C ET TR β 2

14.1 ESSAIS D'INTERACTION DANS LES LEVURES

Pour éliminer ou du moins minimiser les risques de faux-positifs, nous avons d'abord reconfirmé l'interaction entre 14C et la construction de TR β 2 à l'aide d'essais β -galactosidase. Les vecteurs pAS2-1 (TR β 2) et pACT2 (14C) ont été retransformés dans les levures et l'apparition de colonies bleues en présence de X-gal a clairement démontré l'interaction significative entre ces deux protéines.

14.2 INTERACTIONS *IN VITRO* PAR PRECIPITATION AVEC PROTEINES GST

Lorsque l'on utilise la méthode double-hybride, il importe de toujours reconfirmer l'interaction par un autre moyen. Nous avons donc utilisé l'essai de précipitation avec protéine GST dans cette optique. Nos résultats présentés à la figure 22 montrent l'interaction spécifique de 14C avec le domaine de liaison à l'ADN de TR β 2. On observe que TR β 2 entier interagit de façon significative avec 14C (Figure 22 B). Nous avons en notre possession un mutant de TR β 2, TR β 2 (1-120 Δ), construction du récepteur sans les acides aminés 89-116 du domaine A/B. On voit par le résultat obtenu que l'interaction entre les deux protéines est maintenue. Puisque l'appât utilisé lors du double

a)

CTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC
 CCCGGGGATCCGAATTCC¹GGTTCGCGTCGACGTTGGCCGACTGAAGTCAAAAAAGGGTACTGAA³⁷
 GATGCACTGTATAAAAAACCAAAGACGGGCGCAAAGATTGATTGAAGAAATCCATGCCATGAA²¹⁴
 GGAATTGAAACCTGACATAGTAACATAAATCTGCTCTTGGTGATGATATCAACTTTGAAAAAAT²⁷³
 CTTCAAAAAGCCAGATTCTACTGCAACTGAAAGAGCAATTGCCAGACTAGCAGTACATNCTCT³³²
 TCTGAAGAAAAAGATAGATGTGCTAAAAGCTGCTGTACAAGCCTTTAAAGAAGCCAGACATAA³⁹¹
 TGTGCTGAAGTTGAGTCATCAAAGAATGCTTCAGAGGACAATCATTCTGAGAATACTTTGTAT⁴⁵⁰
 TCAAATGATAATGGAAGTAATTTACAGCGTGAAGCAACTGTCATCAGTGAGCAAAAAGTCAA⁵⁰⁹
 GAAACCAAAAATATTGGCGAAGAAACCAATACATAATTCAAAGGAAAAAATAGCAAAGATGGA⁵⁶⁸
 ACATGGACCTAAAGCAGTGACTATTGCAAATTCTCCATCAAAGCCTTCAGAAAAGGATTCTGT⁶⁶⁷
 AGTTTCCCTTGAGTCCCAGAAGACACCTGCTGACCCAAAAGTGAAGTCTAAGTCAAACCAA⁷²⁴
 AAAAAACAAAGGATCTGATAGCTCACTCTCTGGTAACAGGTGA (STOP)

b)

MetKELPDKPDIVTKSALGDDINFEKIFKKPDSTATERAIARLAVHXLLKKKIDVLKAAVQAFKEARH
NVAEVESSKNASEDNHSENTLYSNDNGSNLQREATVISEQKVQETKALAKKPIHNSKEKA^{AK}MEH
 GPKAVTIANSPSKPSEKDSVVSLESQKTPADPKLKTLSQTKKNKGSDSSLSG^{NR}Stop

c)

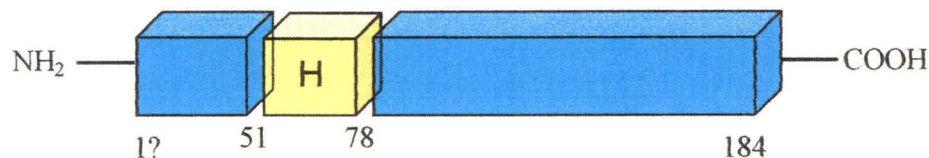


Figure 19

Séquence nucléotidique et protéique de 14C.

a) Séquence nucléotidique de 14C (souligné : vecteur pACT2) b) séquence protéique de 14C (souligné : domaine hélicoïdal) c) Représentation schématique de 14C (h : domaine hélicoïdal).

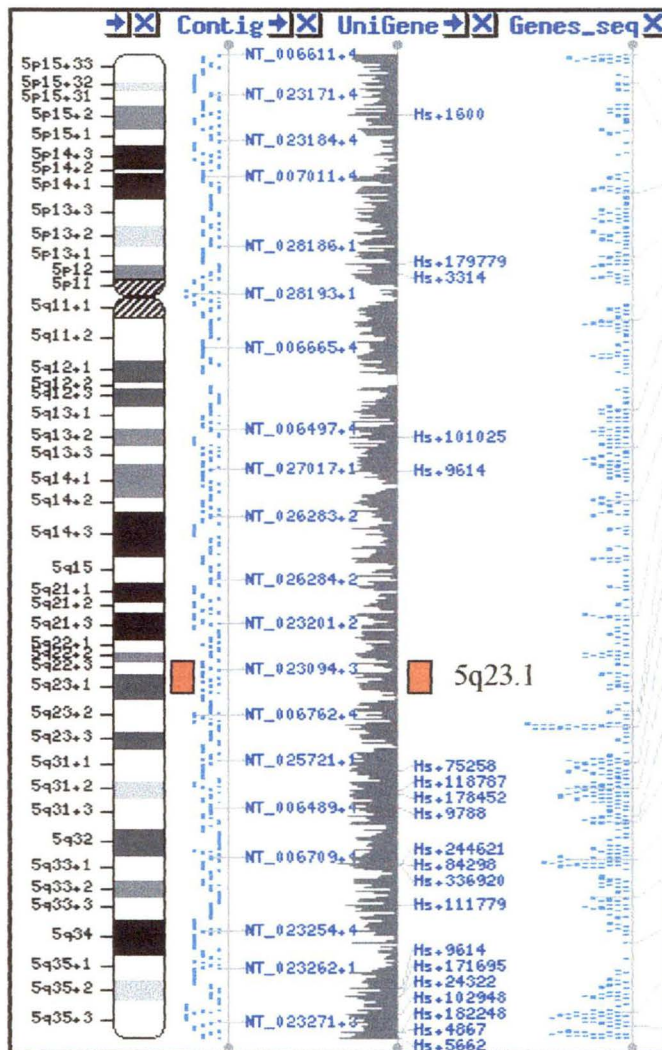


Figure 20

Localisation génomique de 14C.

14C se situe sur le long bras du chromosome 5, plus particulièrement en position 5q23.1 (UniGene Nucleotide, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.cgi>).

Chromosome 5q23.1

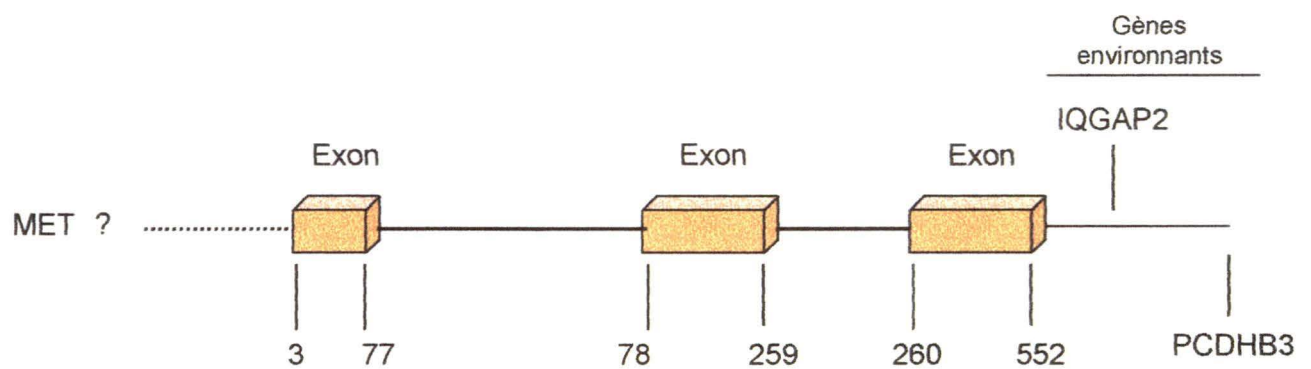


Figure 21

14C est issue de l'épissage de trois exons.

La presque totalité du nouveau cDNA identifié se situe sur cette région très particulière du chromosome 5. Trois exons subissent un épissage pour compléter 99% de 14C.

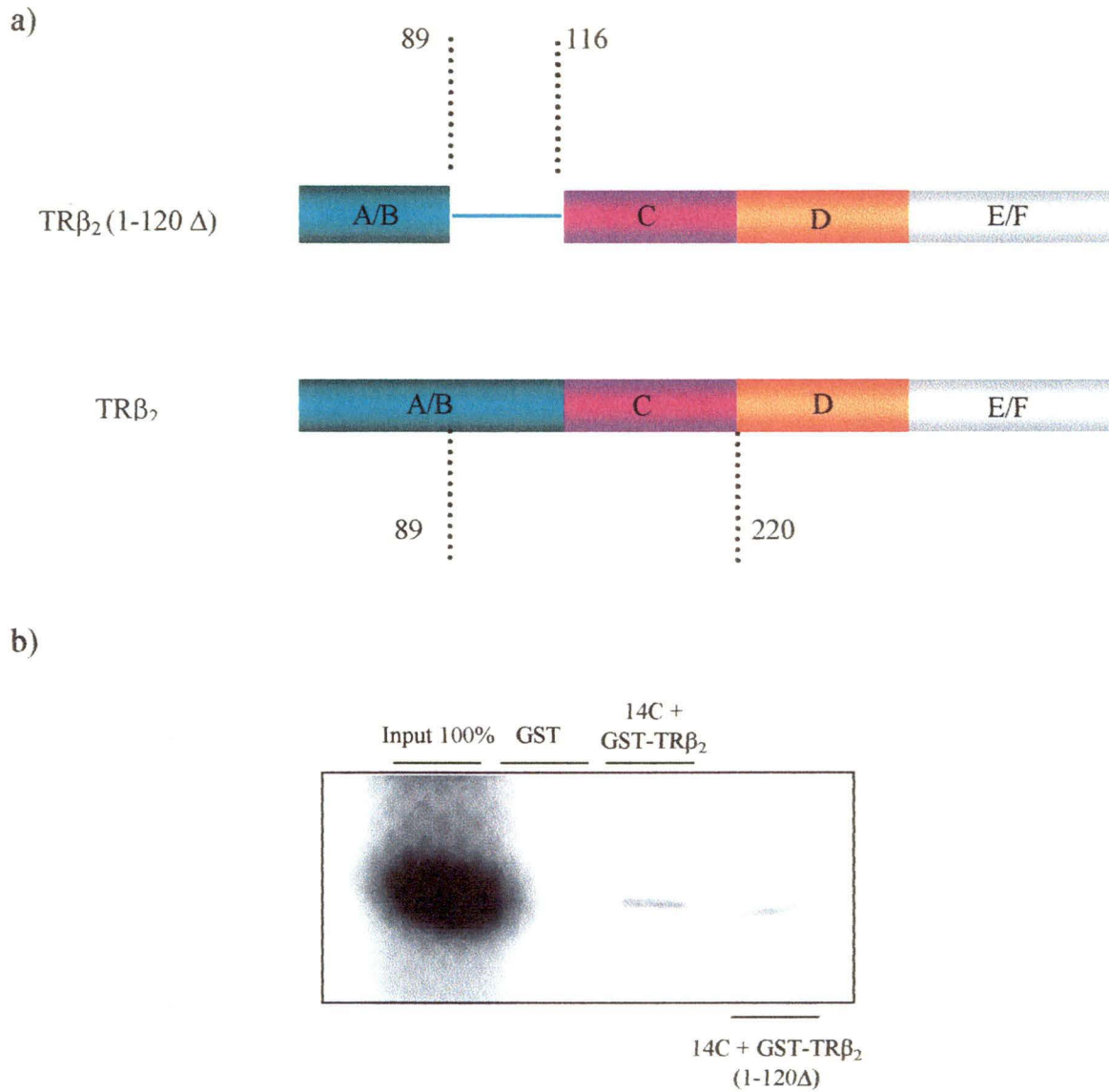


Figure 22

Essai d'interaction avec protéines GST

a) TR β_2 (1-120 Δ), construction du récepteur sans les acides aminés 89-116 du domaine A/B, et TR β_2 b) TR β_2 interagit avec 14C. Un mutant de TR β_2 , TR β_2 (1-120 Δ), interagit aussi avec 14C.

hybride contenait les a.a. 89-220, soit le domaine de liaison à l'ADN de TR β 2 plus les a.a. 89-120 du domaine A/B, nous avons montré que l'interaction entre 14C et TR β 2 se situe probablement au niveau du domaine C du récepteur. On voit également que la protéine GST seule n'interagit pas avec 14C, donc que l'interaction obtenue est spécifique. De plus, puisque qu'une quantité équivalente de protéine marquée a été utilisée à titre de contrôle (normalement on utilise 10%), on peut affirmer que l'interaction est significative. Bref, nous avons ainsi reconfirmé l'interaction obtenue par la méthode du double-hybride et circonscrit cette dernière au domaine de liaison à l'ADN de TR β 2, domaine très conservé à travers les différents types de récepteurs nucléaires.

15.0 CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DE 14C

15.1 CHEZ LE RAT

Puisque nous avons identifié une nouvelle protéine non-répertoriée et que l'accessibilité des tissus d'origine humaine est plus difficile, nous avons d'abord tenté de caractériser l'expression de son ARNm dans les tissus de rats utilisant la technique du RT-PCR (Figure 23). La première piste du gel correspond au standard utilisé pour déterminer la taille des bandes obtenues. L'amplification attendue se situe à 370 pbs. On peut voir que la deuxième piste constitue un contrôle positif où 14C a été amplifiée à partir du vecteur 14C-pACT2. La troisième piste est un contrôle négatif puisque le RT-PCR a été effectué en présence d'eau et non d'ARN. Ce contrôle est essentiel, car il montre que les bandes obtenues dans les pistes

subséquentes sont spécifiques et non le résultat d'un produit non-spécifique d'amplification issu d'une contamination des solutions. Ainsi, les pistes suivantes montrent que 14C est exprimée de façon ubiquiste dans tous les tissus étudiés (hypophyse, hypothalamus, cervelet, cortex cérébral, cœur, foie, rein, muscle squelettique et pancréas) (Figure 23). Étant donné le caractère qualitatif et non quantitatif de l'expérience et la possibilité que les quantités d'ARN utilisées pour chacune des réactions varient, il est difficile d'avancer que 14C est exprimé de façon prédominante au niveau du système nerveux central et du foie, même si l'intensité des bandes est plus grande. L'absence d'un contrôle interne comme l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) dans chacun des tissus nous empêche de nous prononcer sur la quantité relative de 14C dans les différents tissus étudiés. Néanmoins, puisque les amorces utilisées pour caractériser 14C chez le rat ont été construites à partir d'une séquence humaine et que notre résultat pointe vers une expression ubiquitaire de celle-ci, ceci suggère que 14C possède un homologue chez le rat. Il est à noter que lors de la caractérisation de 14C avec les banques d'ADN disponibles, nous avons aussi identifié une certaine homologie avec *mus musculus*, une espèce particulière de rat (annexe A). Il faudra évidemment reprendre ces expériences et quantifier les résultats obtenus.

15.2 CHEZ L'HUMAIN ET DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES

Nous avons utilisé la méthode « dot blot » pour évaluer l'expression de l'ARNm de 14C dans différents organes humains. Il m'a d'abord été difficile d'obtenir une bonne qualité de sonde pour effectuer la l'hybridation. Néanmoins, en augmentant le temps de dénaturation de

l'ADN (4 minutes), j'ai réussi à obtenir 20 à 25 % d'incorporation et procéder à l'expérience dans les limites des conditions suggérées. Les résultats obtenus montrent que 14C est exprimée de façon *quasi* ubiquiste dans les différents tissus étudiés (Figure 24). L'expression semble uniforme et il apparaît ici que 14C est exprimée au niveau de différentes parties du cerveau (incluant l'axe hypothalamo-hypophysaire), de régions particulières du cœur, le long du tube digestif, dans plusieurs organes (placenta, thymus, ganglions), de certaines lignées tumorales, etc. (se référer à la membrane commerciale CLONTECH présentée à la Figure 16). Il est à noter qu'étant donné la faible intensité du marquage obtenu après une exposition de 24 heures, j'ai dû continuer à exposer la membrane commerciale durant une semaine à -80 °C. De plus, après une exposition prolongée, il semble que 14C ne soit pas exprimée au niveau des ovaires. Pour s'assurer que ce résultat était valide, nous avons utilisé l'ubiquitine à titre de contrôle interne. Les résultats montrent à la Figure 25 que ce contrôle est ubiquiste et donc exprimé dans tous les tissus étudiés. On peut donc supposer par soustraction que 14C est absent des ovaires.

16.0 ÉTUDES TRANSCRIPTIONNELLES

Les études par essais luciférase effectuées avec 14C sur les différentes isoformes du récepteur des hormones thyroïdiennes montrent que 14C n'influence pas de façon majeure la régulation de l'activité transcriptionnelle pour un rapporteur positif idéalisé pour les TRs, TRETK (Figure 26). Néanmoins, de concert avec ce que l'on connaît déjà, on observe bel et bien une activation de la transcription pour les différentes isoformes des TRs en présence de T₃

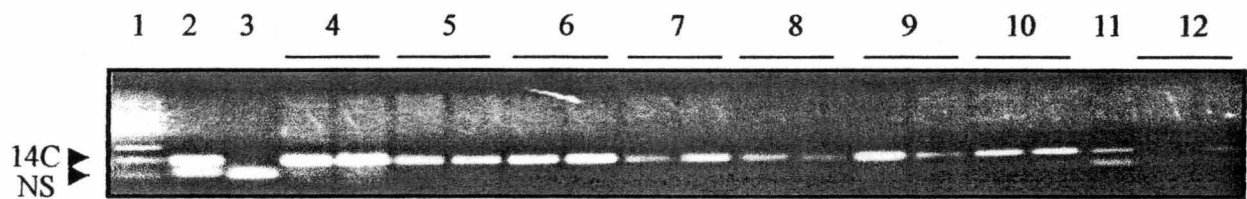


Figure 23

Caractérisation de l'expression de 14C chez le rat par RT-PCR

14C est exprimée de façon ubiquitaire dans tous les tissus de rat étudiés. 1-standard, 2-contrôle positif avec 14C-pACT2, 3-contrôle négatif avec de l'eau distillée, 4-hypophyse, 5-hypothalamus, 6-cervelet, 7-cortex cérébral, 8-cœur, 9-foie, 10-rein, 11-muscle squelettique, 12-pancréas.

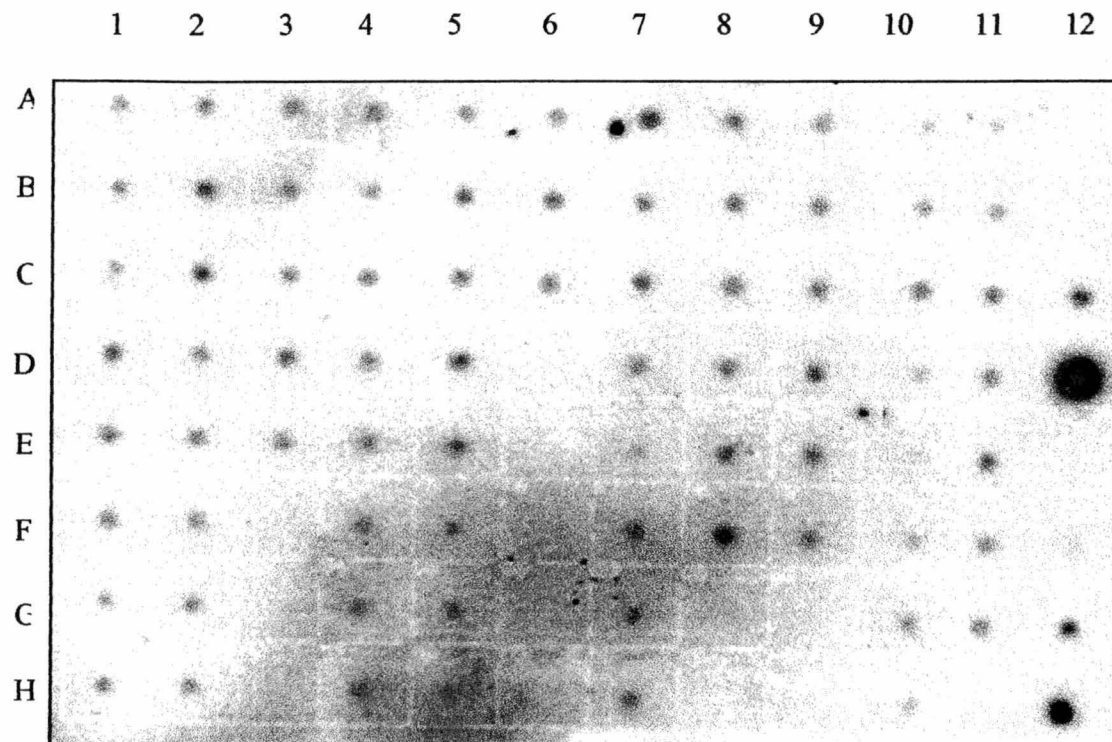


Figure 24

Caractérisation de l'expression de 14C chez le fœtus, l'adulte et différents lignées cellulaires.

14C est exprimée de façon *quasi* ubiquitaire dans tous les tissus étudiés. On peut voir que 14C n'est pas exprimée dans les tissus ovariens (G8).

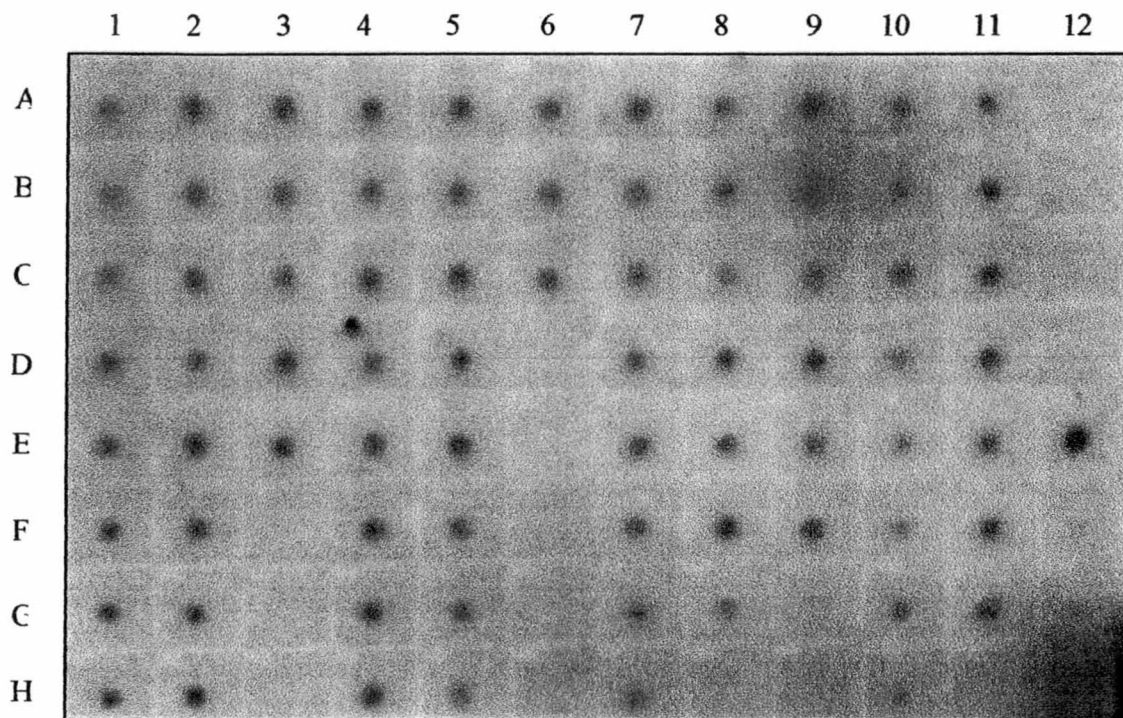


Figure 25

Caractérisation de l'expression de l'ubiquitine chez le fœtus, l'adulte et différents lignées cellulaires.

L'ubiquitine est exprimée de façon ubiquitaire dans tous les tissus étudiés.

Activité luciférase relative

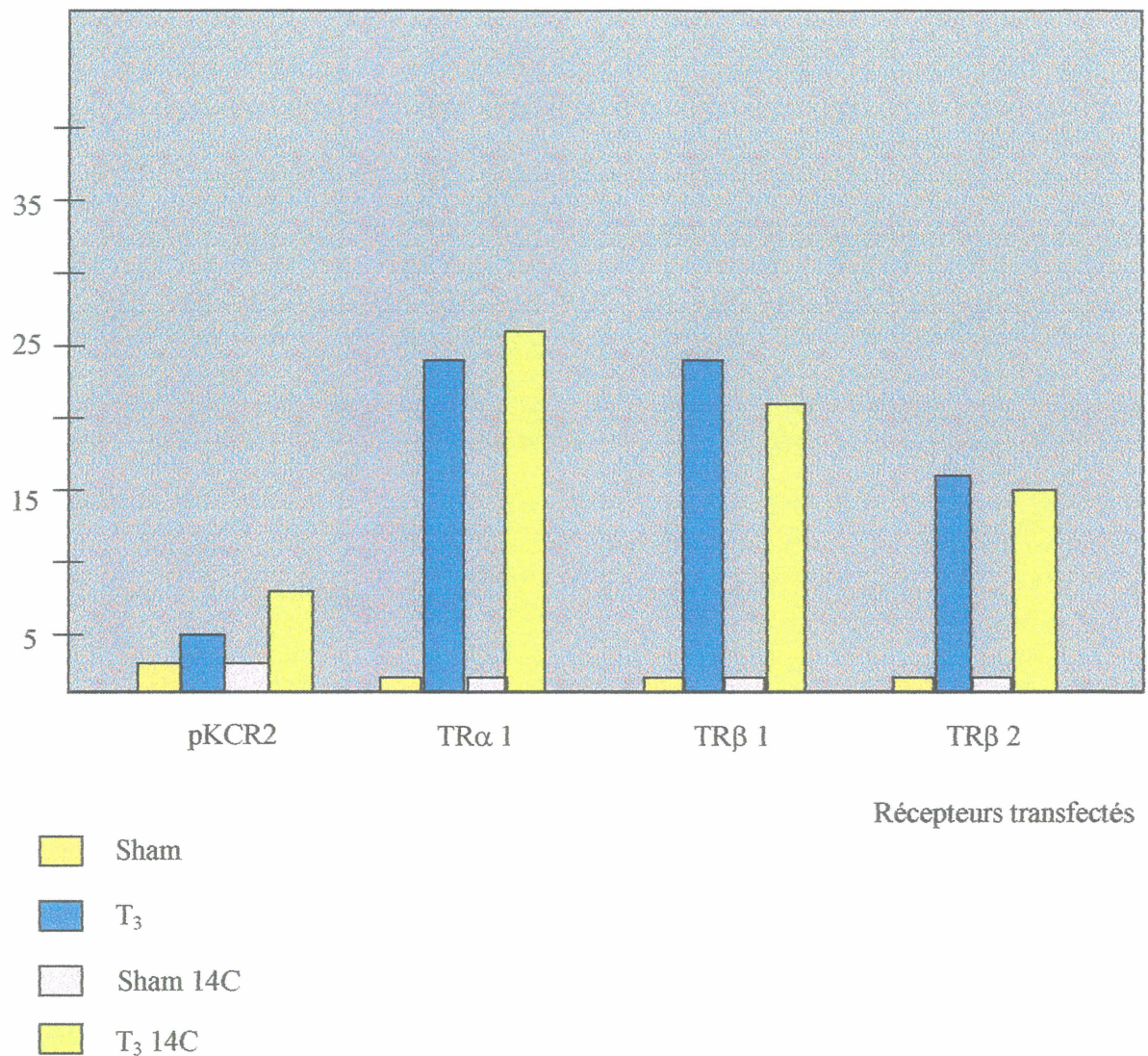


Figure 26

Études transcriptionnelles préliminaires sur TRETk.

Les études par essais luciférase effectuées avec 14C sur les différentes isoformes du récepteur des hormones thyroïdiennes montrent que 14C n'influence pas de façon majeure la régulation de l'activité transcriptionnelle pour un rapporteur positif idéalisé pour les TRs, TRETk.

(McKenna NJ et al., 1999 ; Collinwood TN et al., 1999). De plus, en absence d'hormones, on remarque une répression de la transcription en comparaison avec le contrôle pKCR2 (vecteur vide) (Glass C.K. et al., 1987 ; Brent A et al, 1992). Avec l'addition de 14C, on note une légère diminution de la transcription activée par T₃ pour TRβ1 et TRβ2, mais les résultats obtenus ne sont pas significatifs étant donné l'erreur sur la mesure et le nombre d'expériences limité. Pour TRα1, l'addition de 14C ne modifie pas la transcription activée par T₃. Le nombre d'expériences et le peu de conditions testées peuvent avoir été un obstacle important à l'observation d'un effet transcriptionnel. Des études portant sur la régulation de TREs négatifs comme TRH et TSH n'ont pas eu le temps d'être effectuées dans le cadre du temps consacré à ma maîtrise, mais celles-ci pourraient être pertinentes dans l'hypothèse que TRβ2 serait un joueur important de la régulation des gènes impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophysaire (Langlois et al., 1997 et Abel et al., 2001).

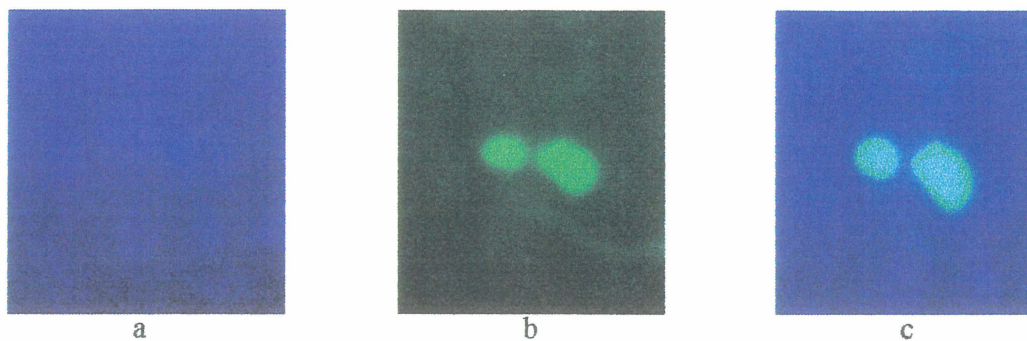
17.0 LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE 14C

Les expériences suivantes tentent de préciser la localisation subcellulaire de 14C, celle de TRβ2, puis la colocalisation des deux protéines. Le noyau des cellules CV-1 est coloré au DAPI et les protéines fusionnées avec des variantes de GFP sont visualisées par microscopie de fluorescence verte, rouge et bleue.

On remarque d'abord que 14C-GFP se localise principalement au niveau du noyau de la cellule. Elle colocalise avec le DAPI, un marqueur nucléaire (Figure 27 A a,b,c). La majorité des études effectuées (environ 90%) ont montré ce patron de distribution pour notre protéine. On peut donc supposer que 14C, du moins dans sa forme partielle fusionnée à GFP, est une protéine nucléaire. Pour évaluer plus objectivement les résultats obtenus, il faudrait, pour chacune des expériences, évaluer un nombre de champ précis pour rapporter la proportion exacte de cellules où 14C se localise au noyau et à son pourtour (voir le CD joint pour une meilleure qualité des images de fluorescence).

TR β 2 est une protéine de la famille des récepteurs nucléaires de classe 2. On sait que ce récepteur est situé principalement au noyau en absence comme en présence d'hormones thyroïdiennes (Yen PM et al., 2001). Ainsi, comme on peut le voir à la Figure 27 B (d) TR β 2-pDsRed est majoritairement localisée au noyau en absence de T₃ dans les cellules de type CV-1. À la Figure 27 B (e), on remarque la colocalisation entre 14C et TR β 2. Il est à noter que TR β 2 se retrouve seul en périphérie du noyau des cellules CV-1.

A)



B)

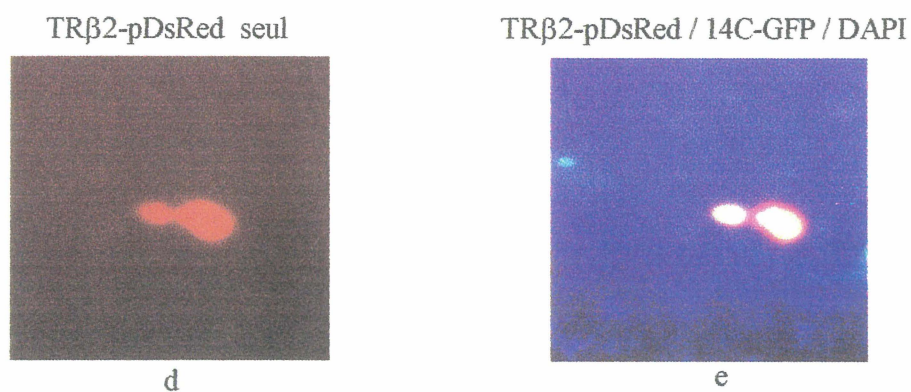


Figure 27

Études par microscopie de fluorescence.

A (a, b, c) Localisation subcellulaire de 14C. B (d, e) Colocalisation de 14C et TRβ2. 14C-GFP se localise principalement au niveau du noyau de la cellule (b) et elle colocalise avec le DAPI, un marqueur nucléaire (c). TRβ2-pDsRed est majoritairement localisée au noyau en absence de T₃ (d). 14C et TRβ2 colocalisent au noyau de la cellule (e).

IX. DISCUSSION

À l'aide de la méthode du double-hybride dans les levures, nous avons identifié une nouvelle protéine interagissant avec la portion 89-220 du récepteur des hormones thyroïdiennes de type $\beta 2$. Les résultats obtenus par cette méthode nous ont permis d'identifier de nouvelles protéines interagissant avec ce récepteur et parmi celles-ci 14C. Nous avons ainsi séquencé les différents clones pour identifier 14C, composé d'une séquence nucléotidique de 565 paires de bases, correspondant à une protéine de 184 acides aminés non répertoriée dans les banques de séquences disponibles. Pour tenter de clarifier le rôle de cette protéine, nous avons analysé celle-ci à la recherche de domaines fonctionnels. Or, 14C contient un domaine hélicoïdal (a.a. 51 à 78), structure protéique quaternaire très fréquente et non-spécifique souvent responsable de phénomènes d'hétérodimérisation entre protéines.

Lorsqu'on utilise la méthode du double-hybride, il est essentiel de reconfirmer l'interaction protéique. Nous avons commencé par reconfirmer l'interaction dans les levures par essais β -galactosidase. Les vecteurs identifiés ont donc été retransformés dans les levures et l'apparition de colonies bleues a clairement démontré l'interaction significative entre ces deux protéines. De façon complémentaire, à l'aide de la méthode d'essai d'interaction par précipitation utilisant les protéines GST, nous avons circonscrit le domaine d'interaction de 14C au domaine de liaison à l'ADN de TR $\beta 2$, en plus de reconfirmer l'interaction protéique dans un autre système *in vitro*. J'ai d'abord eu plusieurs difficultés lors de la production de 14C *in vitro*. J'ai fait varier la quantité d'ADN utilisé (0,5 μ g, 1 μ g et 1,5 μ g) et le temps de

production de la protéine (20, 30 et 45 minutes) afin d'identifier les conditions optimales de production. En utilisant 1 µg d'ADN et en permettant 30 minutes de transcription/traduction, j'ai réussi à obtenir une quantité adéquate de protéine marquée. De plus, la production des protéines GST a due aussi être optimisée. C'est ainsi que j'ai fait varier les concentrations d'IPTG utilisées lors de l'induction (0,1 mM, 0,5 mM, 1mM et 0,05mM) en plus faire varier le temps d'incubation (1 h, 2 h, 3 h et 4 h). Après migration sur gel SDS 10 %, les conditions optimales furent 0,05 mM d'IPTG durant 3 h. Mes travaux ont montré l'interaction spécifique de 14C avec le domaine de liaison à l'ADN de TRβ2. Lorsque 14C est incubée avec la protéine GST seule, il n'y a pas d'interaction. Néanmoins, on voit que TRβ2 entier interagit de façon significative avec 14C. D'autre part, un mutant de TRβ2, TRβ2 (1-120Δ), construction du récepteur sans les acides aminés 89-120 du domaine A/B, interagit aussi avec 14C. L'appât utilisé lors du double-hybride contenait les a.a. 89-220, soit le domaine de liaison à l'ADN de TRβ2 plus les a.a. 89-120 du domaine A/B. J'ai donc démontré par soustraction que l'interaction entre 14C et TRβ2 se situait probablement au niveau du domaine C du récepteur, structure très conservée à travers les récepteurs nucléaires. La littérature actuelle se penche sur de nouvelles fonctions pour le domaine C des récepteurs nucléaires : bon nombre de protéines interagissent avec le domaine de liaison à l'ADN des différents RNs pour influencer leur activité transcriptionnelle et agir ainsi à titre de corégulateurs (Lan K et al., 2002; Takahiro I et al., 2001; Mathur m et al., 2001; Oesterreich S. et al., 2000 ; Blanco JC et al., 1998). De plus, une nouvelle protéine nommée MYST a aussi été décrite pour influencer l'activité transcriptionnelle des RNs (Sharma M et al., 2000). Bien sûr, étant donné que le

domaine de liaison à l'ADN est très conservé parmi les différents récepteurs nucléaires, il aurait été intéressant de montrer l'interaction de 14C avec les autres récepteurs comme RXR, ER, VDR ou GR. J'ai tenté un essai de précipitation avec protéines GST, mais la production de 14C en fusion avec GST demeurait difficile. Encore une fois, j'ai fait varier les concentrations d'IPTG et utilisé différentes durées pour l'étape de transcription (cf ci-haut), sans obtenir de quantité suffisante de protéine de fusion pour procéder à l'étape de précipitation. Il est évident qu'une étape importante dans la caractérisation de cette nouvelle protéine sera de bien caractériser son interaction avec les autres récepteurs nucléaires. Un autre moyen de vérifier l'interaction de 14C avec les TRs et même les autres récepteurs nucléaires serait d'utiliser la co-immunoprécipitation *in vitro* ou dans des cellules de mammifères. Or, cette méthode requiert la production d'un anticorps contre 14C. Étant donné le caractère inconnu de notre protéine, un moyen de produire des anticorps contre celle-ci serait de l'injecter chez le lapin. À mon départ du laboratoire, nous avons l'approbation nécessaire de l'animalerie pour ce projet.

Afin de mieux cerner le rôle de la protéine identifiée, nous avons ensuite comparé notre séquence protéique avec différentes banques de données disponibles. Le cDNA identifié ne possède aucune homologie significative avec une séquence déjà répertoriée. Certaines homologies mineures sont observées, mais aucune d'elle n'est significative. On peut noter par exemple que le cDNA RIKEN de *Mus musculus*, un type de rat, correspond en partie au cDNA de 14C. 14C ne contient aussi aucun domaine particulier si ce n'est qu'un domaine hélicoïdal (a.a. 51 à 78), structure protéique quaternaire très fréquente et non-spécifique

(Annexe A). Néanmoins, quelques petites similarités sur quelques paires de bases étaient retrouvées dans des portions connues non-codantes du génome humain. En analysant de plus près ces séquences, nous avons trouvé qu'elles se retrouvaient sur une portion très circonscrite du chromosome 5. Il apparaît ainsi que 14C provient d'au moins trois exons relativement rapprochés situés dans la région q23.1 de ce chromosome. Les trois séquences semblent épissées pour former la séquence de 14C. Ainsi, on peut voir que l'épissage de 14C provient de 3 exons particuliers s'unissant pour former la séquence obtenue et couvrant exactement 99% de la séquence que nous avons trouvée par la technique du double-hybride.

Bien que la majorité du cDNA identifié soit retrouvé au niveau de ce chromosome, la séquence ne contient pas la séquence de bases azotées correspondant à la méthionine de départ (ATG) de notre protéine. Or, cette séquence est essentielle pour l'initiation de la transcription de toute protéine. Cette première méthionine sert, entre autres, à l'initiation de la traduction et à la reconnaissance de plusieurs régulateurs importants pour celle-ci. À ce moment, deux hypothèses principales se posent : cette méthionine pourrait être d'abord issue d'un épissage unique ailleurs aux alentours du gène de 14C ou, dans un deuxième temps, cette dernière n'est peut-être pas la méthionine de départ et 14C représenterait ainsi un cDNA incomplet. Des données récentes tirées d'expériences effectuées par le laboratoire après mon départ vont en ce sens. Puisque la première hypothèse est moins probable et que la méthode du double-hybride dans les levures tend à fournir des clones partiels ou seule la partie qui interagit fortement avec l'appât est repêchée (Sharma M. et al., 2000), nous avons retenu et

approfondi la deuxième hypothèse. Une méthode utilisée afin d'identifier une partie 5' d'un cDNA incomplet est le 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Tel que décrit plus haut, on utilise une transcription inverse et une polyadénylation du cDNA obtenu pour générer des sites de reconnaissance spécifiques qui nous permettent d'amplifier la portion 5' d'un cDNA. Le produit amplifié est cloné, puis le tout est séquencé à la recherche de la portion 5' d'une séquence. Utilisant cette méthode, il m'a été impossible, lors de mes trois tentatives, d'amplifier la portion manquante de 14C. Cette technique est longue, complexe et comporte plusieurs difficultés. Seule l'intégrité des produits à chacune des étapes permet d'obtenir les résultats escomptés. Lors de mes tentatives, j'ai essayé de varier mes conditions de PCR et de valider par des contrôles les étapes critiques de la méthode. Suite à la difficulté d'obtenir des contrôles représentatifs et devant ces résultats négatifs, j'ai ensuite tenté d'augmenter la qualité et l'efficacité de l'extraction d'ARN dans les cellules CV-1. J'ai donc varié la méthode utilisée et fait preuve d'une grande prudence lors de la manipulation de l'ARN (la présence de RNase peut contribuer à dégrader l'ARN ou diminuer sa qualité), le tout, sans succès. Tel que décrit plus haut, j'ai tenté d'optimiser mes conditions d'amplification par PCR en abaissant la température et en permettant au delà de deux minutes d'élongation par cycle pour diminuer la spécificité et d'optimiser mes conditions de PCR. Ces changements au protocole ont néanmoins échoués. Il est possible que les amorces utilisées forment des structures secondaires à une étape ou une autre du processus et empêche la liaison des amorces à l'ADN. L'ARN peut aussi former des structures secondaires interrompant la transcription inverse. La présence de guanine dans la séquence choisie contribue à favoriser la formation de ces structures. Ainsi, un moyen de minimiser la

formation de tels complexes serait d'imaginer des amorces qui amplifieraient une portion plus courte du cDNA (tout en s'assurant de l'amplification carboxy-terminale ne soit pas compromise). Néanmoins, compte tenu que notre laboratoire travaille surtout avec de l'ADN (utilisation fréquente de RNAses) et que mes collègues et moi éprouvions à ce moment des problèmes de dégradation d'ARN, il m'apparaît que l'étape critique se situe dans la difficulté à obtenir un ARN intègre et de bonne qualité. Une alternative temporaire à ce problème pourrait être la réalisation d'un buvardage de type Northern, technique nous permettant d'observer la présence de différentes formes d'ARNm et d'en comparer la taille avec celle du cDNA de 14C, ou l'utilisation de la technique d'extension d'amorces. Néanmoins, le problème de qualité d'ARN est aussi une préoccupation importante pour cette technique. Nous nous devons d'identifier cette portion 5' de la séquence de 14C pour bien clarifier le rôle fonctionnel de 14C. La séquence connue peut être la région importante pour l'interaction protéique, alors que un ou des domaines fonctionnels importants peuvent se retrouver en amino-terminal du cDNA identifié. La découverte d'autres domaines d'interaction importants pourraient renforcer l'interaction avec le domaine de liaison à l'ADN et permettre l'identification d'interactions jusqu'alors non significatives.

Lors de la caractérisation de notre cDNA sur le chromosome 5, nous avons identifié des gènes pouvant fournir des avenues intéressantes pour l'étude localisation-fonction de 14C. Les gènes environnants peuvent être contributifs dans la recherche d'une fonction particulière et peuvent parfois permettre d'orienter la recherche d'une fonction protéique. À titre d'exemple, afin d'illustrer le fait que certains gènes très rapprochés peuvent s'influencer, nous n'avons qu'à penser aux transformations tumorales qui résultent parfois de l'activation

d'un gène impliqué dans la croissance cellulaire par un gène adjacent (répresseur désactivé ou activateur enclenché) (Powers CA et al., 1998). Ces gènes environnants peuvent nous donner des indices nous permettant d'identifier le rôle de notre protéine. 14C se situe donc aux alentours des gènes IQGAP2, gène important pour l'inhibition de l'activité GTPase sur Cdc42, et PCDHB3, gène impliqué dans l'adhésion cellulaire et plus particulièrement l'adhésion neuronale. Ces gènes, leurs produits et leurs rôles pourraient donc nous donner certains indices en rapport à la fonction de 14C, surtout que les hormones thyroïdiennes sont impliquées dans des phénomènes d'adhésion cellulaire et de croissance neuronale (Siegrist-Kaiser CA et al., 1990 ; Bernal J et al., 1999 ; Oppenheimer JH et al., 1997).

Puisque nous avons identifié une nouvelle protéine non-répertoriée et que l'accessibilité des tissus d'origine humaine est difficile, nous avons d'abord tenté de caractériser l'expression de notre protéine dans les tissus de rats. Lors de la mise au point de la technique, nous avons éprouvé quelques difficultés : mauvaise qualité d'ARN, message amplifié insuffisant, conditions d'amplification difficiles à ajuster, etc. Puisque le produit d'amplification est petit, il fallait utiliser une concentration plus élevée de bromure d'éthidium (2 %) pour bien marquer les bandes et avoir une bonne intensité lors de la mesure en spectrophotométrie. De plus, nous devons faire migrer le produit d'amplification moins longtemps pour optimiser encore une fois la qualité du résultat. Néanmoins, après quelques mises au point du protocole, nous avons démontré que 14C est présente dans tous les tissus étudiés. On remarque que 14C est présente au niveau du système nerveux central et que ce résultat est très intéressant compte tenu que TR β 2 est préférentiellement exprimé au niveau

de l'hypophyse et de l'hypothalamus. Ceci, en plus de dresser un patron d'expression de notre protéine, confirme la présence d'un homologue partiel chez le rat. L'utilisation de différentes séquences d'amorces pour le RT-PCR aurait pu nous permettre de définir cet homologue, puisque plus les séquences nucléotidiques utilisées pour le PCR se rapprochent de la séquence du rat, plus l'interaction est forte et plus l'amplification efficace. Bien qu'il nous fut impossible de quantifier l'expression de 14C dans ces tissus, on peut néanmoins supposer une certaine variabilité d'expression. Une façon de quantifier le tout serait de comparer les niveaux d'expression d'une protéine constitutive comme l'actine, GAPDH ou l'HPRT avec ceux de notre protéine. Dans le but d'établir un lien entre la localisation et la fonction, il sera important de clarifier cet aspect quantitatif.

Toujours de façon qualitative, nous avons montré que le cDNA identifié se retrouvait dans les tissus humains et dans différentes lignées cellulaires à l'aide de la méthode du dot blot. Les résultats obtenus montrent que 14C est encore exprimé de façon *quasi* ubiquitaire dans les différents tissus étudiés (voir résultats pour une description détaillée). Ce résultat corrobore bien avec celui obtenu par les études effectuées chez le rat. Il est à noter que malgré une exposition d'une semaine, 14C est présente en très faible quantité (sinon absente) dans les ovaires. Afin de bien évaluer cet aspect, nous avons comparé les résultats obtenus avec celui d'un contrôle exprimé de façon ubiquitaire : l'ubiquitine. Or, il apparaît que ce marqueur est exprimé même au niveau des ovaires donc que la membrane contient bel et bien de l'ARN pour les ovaires et que 14C y est absente. L'absence de 14C dans les ovaires pourrait nous orienter vers un modèle cellulaire intéressant (utilisation de cellules CHO) pour l'étude de la

fonction de celle-ci. On pourrait supposer que l'ubiquité partielle de l'expression de notre protéine pourrait aussi traduire une fonction de base importante sur le plan du fonctionnement cellulaire, puisque plusieurs protéines ubiquitaires ont des fonctions primordiales dans la cellule (exemple : l'actine). On remarque cependant que la méthode utilisée ne nous permet pas, encore une fois, d'émettre d'hypothèses quant à la longueur totale du cDNA de 14C. Elle nous renseigne uniquement sur son patron d'expression. Pour pallier à ce problème, nous aurions pu utiliser la technique du buvardage d'ARN, car celle-ci nous aurait permis d'identifier les formes possibles d'ARNm dans une population cellulaire ou tissulaire donnée. Les difficultés rencontrées lors de l'extraction d'ARN m'ont empêchées d'obtenir des résultats satisfaisants et de produire une membrane propice à l'hybridation adéquate. À long terme, l'hybridation *in situ* pourrait être une avenue intéressante pour la localisation tissulaire de 14C. L'utilisation de cette méthode pourrait nous renseigner sur la localisation cellulaire et subcellulaire de 14C.

La localisation intracellulaire des récepteurs nucléaires est primordiale pour leurs fonctions. Tel que décrit plus haut, les récepteurs de classe II peuvent lier l'ADN en absence et en présence de leur ligand et ne s'associent pas aux hsps (Meier, 1997 ; Greenspan F et al., 2001). En utilisant des constructions fluorescentes, nos études suggèrent que 14C est une protéine nucléaire en absence d'hormones thyroïdiennes. Tel que décrit dans la littérature, une première construction de TR β 2 fusionnée à un marqueur fluorescent rouge montre une localisation principalement nucléaire pour ce dernier en absence de T₃ (Yen et al., 2001). Nous avons montré que 14C, fusionné à une protéine fluorescente verte, se localise aussi au

noyau (absence de T_3). La co-localisation de ces deux protéines a montré un patron diffus circonscrit au noyau. Aucune topographie nucléaire particulière ne fut observée. Ces résultats suggèrent que 14C est une protéine qui, comme TR β 2, se localise principalement au noyau en absence de T_3 . Étant donné les limites de l'image obtenues, il est difficile de conclure quant à la co-localisation de ces deux protéines. Plus encore, pour produire une protéine fluorescente, il faut la fusionner à une autre protéine, ce qui peut altérer sa localisation subcellulaire (Schwillw P., 1999). Pour répondre à cette inquiétude, nous avons transfecté la protéine fluorescente seule et observé qu'elle se localisait davantage au niveau du cytoplasme de la cellule. De plus, l'image en microscopie de fluorescence nous donne une vue superposée des noyaux en deux dimensions, ce qui peut altérer l'interprétation des résultats. Des études en contraste de phase ou de microscopie confocale pourraient davantage nous renseigner sur ce point. Afin de bien circonscrire la localisation de notre protéine au noyau et d'identifier de faibles différentielles d'expression, des études sur fractions cellulaires seront nécessaires. Mais puisque TR β 2 est un récepteur nucléaire de classe 2, type de récepteur se localisant principalement au noyau en présence comme en absence d'hormones thyroïdiennes, il est intéressant de retrouver notre protéine principalement localisée au noyau. Son action pourrait néanmoins s'exercer ailleurs, compte tenu qu'une partie du cDNA est encore inconnu et que d'autres protéines identifiées dans le laboratoire semblent avoir plutôt des effets non-génomiques. De plus, la complétion récente du séquençage de la construction fluorescente de TR β 2 montre certaines mutations ponctuelles qui pourraient influencer sa localisation cellulaire et altérer les résultats que j'ai obtenus. Ces études devront aussi être répétées avec la séquence complète de la protéine inconnue.

En effectuant des études transcriptionnelles par essais luciférase, nous avons montré que 14C n'influence pas de façon importante la régulation par les TRs de TRETK, un rapporteur positif idéalisé pour l'étude de l'activité transcriptionnelle des TRs dans les conditions étudiées. Ce rapporteur possède une configuration palindromique double qui favorise la liaison des TRs et l'étude de l'activité transcriptionnelle par des niveaux d'activité très élevé (Chatterjee V.K. et al., 1991). L'expérience est valide et concorde avec ce que l'on connaît déjà sur ces récepteurs, puisqu'on observe bel et bien une activation de la transcription pour les différents isoformes des TRs en présence de T_3 . De plus, en absence d'hormones, on remarque une répression de la transcription en comparaison avec le contrôle pKCR2 (Glass C.K. et al., 1987). Pour 14C, on note une diminution de la transcription pour TR β 1 et TR β 2, mais les résultats obtenus ne sont pas significatifs lorsque l'on considère seulement deux expériences. Ces résultats très préliminaires montrent que la fonction principale de 14C ne semble pas être de réguler l'activité transcriptionnelle de TR β 2 et même des TRs en général. Néanmoins, plusieurs raisons pourraient expliquer ces résultats : absence d'un modèle cellulaire adéquat pour l'étude des effets transcriptionnels de 14C, niveau de base important de 14C dans les cellules CV-1 utilisées ou activité de 14C limitée aux rapporteurs négatifs comme TRH ou TSH. D'abord, les cellules CV-1 ne représentent peut-être pas un modèle cellulaire adéquat : 14C pourrait être exprimée en quantité suffisante pour que nous ne soyons pas en mesure d'apprécier son action sur l'activité transcriptionnelle des TRs en la surexprimant. Selon les résultats obtenus par dot-blot, les cellules ovariennes de type CHO représenteraient donc peut-être un type cellulaire mieux adapté où nous pourrions

surexprimer notre protéine et envisager d'étudier son effet sur la transcription. Il faudrait bien sûr caractériser l'expression de 14C dans ces cellules avant de procéder à des essais transcriptionnels. Ensuite, par la distribution beaucoup plus spécifique de TR β 2 en comparaison aux autres TRs (hypophyse, hypothalamus, système nerveux central), il est possible que 14C agisse sur la transcription de gènes régulés négativement par TR β 2 comme TRH ou TSH. Puisque 14C est aussi exprimé au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus (voir résultats) et que TR β 2 est l'isoforme importante dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, on peut penser que notre protéine agirait peut-être sélectivement sur les gènes qui font parti de cet axe. Lors de mes travaux, j'ai tenté de répondre en partie à quelques unes de ces questions. En ce qui concerne la surexpression de 14C, j'ai effectué des études dose-réponse où la concentration de 14C utilisée pour les différents essais transcriptionnels étaient de 250 ng, 500 ng, 750 ng et 1000 ng. Malheureusement, la qualité de l'ADN utilisé pour TRETCK faisait à ce moment défaut et les niveaux de réponse étaient très faibles. Il m'a été alors impossible de tirer de bonnes conclusions où même de reproduire de façon adéquate les comportements connues des récepteurs. Pour valider le modèle utilisé, il faudrait analyser la présence de 14C dans les cellules CV-1 par RT-PCR semi-quantitatif, buvardage de type Western ou Northern. Encore une fois, les difficultés reliées à l'extraction d'un ARN de qualité (voir discussion sur RT-PCR) m'ont empêchées de répondre à cette question. D'autres études transcriptionnelles devront être faites pour valider ces hypothèses. Les résultats obtenus sont préliminaires et effectués en utilisant un cDNA peut-être incomplet. On peut imaginer que le domaine fonctionnel de 14C peut se retrouver sur une autre portion en amino-terminal de la séquence trouvée. Cette région absente, l'effet transcriptionnel de

14C pourrait être masqué. Avant de procéder à toutes autres études par essai luciférase, nous devons d'identifier cette séquence inconnue par la méthode du 5'-RACE (voir ci-haut). Il faudrait enfin s'assurer que 14C transfectée est bel et bien exprimée dans les cellules utilisées. Pour ce faire, nous pourrions utiliser différentes techniques dont le buvardage de type Western.

X. CONCLUSION et PERSPECTIVES

En résumé, rappelons d'abord qu'afin de trouver de nouveaux cofacteurs interagissant avec TR β_2 , nous avons utilisé la méthode double-hybride pour cribler une librairie d'ADNc de cerveau fœtal humain avec comme appât la partie 89-220 de TR β_2 . Différents clones furent identifiés, dont 14C, un ADN codant pour une protéine non-répertoriée d'au moins 184 acides aminés contenant un domaine hélicoïdal. Nous avons ensuite comparé 14C avec les banques de séquences génomiques et protéiques disponibles. La protéine identifiée ne correspondait à aucune autre protéine déjà répertoriée. Le gène de 14C se situe sur le bras long du chromosome 5 humain, plus particulièrement en position 5q23.1 où l'ADNc est probablement partiel et issu d'au moins trois exons. Suite à la confirmation de l'interaction entre 14C et TR β_2 dans les levures, des études ont été entamées afin de cerner cette interaction par la technique de «GST-pulldown». Ces études ont confirmé l'interaction entre 14C et TR β_2 et localisée celle-ci au DBD. L'expression de cette nouvelle protéine a été

caractérisée dans des tissus de rat par RT-PCR et nous avons observé que 14C est exprimée de façon ubiquitaire dans les différents tissus étudiés. 14C possède donc un homologue du moins partiel chez le rat. L'étude d'ARNs provenant de tissus humains utilisant la technique du dot blot a permis de confirmer l'expression ubiquitaire quoique faible de 14C et de mettre en évidence son absence possible dans les ovaires. Une analyse de colocalisation utilisant des protéines fluorescentes montre que, comme TR β 2, 14C se situe principalement au noyau et à son pourtour en absence de T₃. Enfin, des études transcriptionnelles préliminaires par essais luciférase sur un rapporteur positif ont montré que 14C ne semblait pas influencer cette fonction des TRs.

Plusieurs problèmes demeurent : l'extraction d'un ARN de qualité, l'identification de la séquence inconnue par la technique du 5'-RACE, l'analyse de la corrélation localisation-fonction sur le génome et l'étude du rôle des gènes à proximité de 14C, la caractérisation de l'interaction de 14C avec les autres récepteurs nucléaires, le problème lié aux mutations de la construction du vecteur fluorescent rouge contenant TR β 2, les difficultés liées à l'analyse quantitative de la microscopie par fluorescence, l'absence d'un modèle cellulaire adéquat pour l'étude des effets transcriptionnelles de 14C, le possible niveau de base important de 14C dans les cellules CV-1 utilisées ou l'activité de 14C limitée aux rapporteurs négatifs comme TRH ou TSH, et la probabilité qu'un domaine fonctionnel se retrouve en amino-terminal de la séquence décrite.

En perspective, les différentes solutions proposées en regard de la qualité d'extraction de l'ARN devront être mises en application pour permettre des conditions optimales d'expérimentation. Le 5'-RACE est primordial pour l'évolution du projet et nous nous devons d'élaborer de nouvelles avenues pour réussir à obtenir la séquence inconnue de 14C (utiliser d'autres amorces, élaborer des contrôles à chacune des étapes, optimiser l'extraction de l'ARN ou varier les conditions de PCR). L'interaction entre 14C et les TRs devra être reconfirmée par l'utilisation d'anticorps. Bien sûr, les études de colocalisation par microscopie de fluorescence seront reprises avec le cDNA complet en utilisant une construction de TR β 2 adéquate et les résultats obtenus devront être validés par buvardage de type Western utilisant des fractions cellulaires. L'hybridation *in situ* pourrait aussi devenir une alternative importante dans la caractérisation de l'expression de 14C. Enfin, les études transcriptionnelles devront aussi être reprises utilisant un modèle cellulaire bien défini comme les cellules ovariennes de type CHO qui représenteraient peut-être un type cellulaire mieux adapté que CV-1 où nous pourrions surexprimer notre protéine et envisager d'observer son effet sur la transcription. De plus, différents rapporteurs positifs et négatifs devront être utilisés pour bien caractériser l'effet transcriptionnel de 14C. Bien sûr, ces études devront être réalisées avec le cDNA complet pour s'assurer que l'absence d'un domaine fonctionnel ne nous empêche pas d'observer l'effet de 14C sur la transcription.

XI. REMERCIEMENTS

L'expérience d'une maîtrise en physiologie m'a permis de me familiariser avec le travail en équipe, aussi bien que le domaine de la science. Plusieurs personnes ont contribué à faire de ce voyage une expérience inoubliable. Elles ont tous, à un moment ou un autre, été déterminantes dans la réalisation de mes objectifs.

D'abord, sincères remerciements au Dre Marie-France Langlois, qui, m'a non seulement permis d'effectuer mes recherches dans son laboratoire, mais m'a aussi guidé dans mes instants d'incertitudes et de découragements. Son réconfort, ses bon conseils et son expertise m'ont été essentiels dans la réalisation de mes objectifs.

Merci au Dr. Liette Laflamme, ma «deuxième maman». Ses connaissances étendues, son écoute continue et ses encouragements ont fait d'elle, non seulement une collègue de travail, mais une confidente inoubliable. Merci aussi au Dr. André Plante d'avoir cru en moi et d'être devenu aujourd'hui, plus qu'un patron, un ami.

Merci Danielle et Geneviève pour votre bonne humeur. Nos discussions épicées et l'amitié que nous avons développées tout au cours de ces années ont motivé mon apprentissages et ont rendu mes journées agréables. Sans vous, je n'aurais pu y arriver.

Merci aux stagiaires qui, au cours de la dernière année, sont passés dans le laboratoire. En particulier à Marie-Belle qui a eu le courage de reprendre où j'avais laissé, à Pierre-Luc qui, par son passage remarqué, a fait de moi un homme plus débrouillard et à Vincent qui m'a accompagné dans mes longues heures de travail du mois de janvier.

Merci à tous les membres du département de physiologie et du service d'endocrinologie. L'ardeur contagieuse avec laquelle vous menez vos projets a su m'inspirer.

Merci à mes parents, mes amis (Marco, Hugo et J-F) pour leur écoute et leur support.

Enfin, merci tout spécial à Rachelle pour ton amour, ton amitié, tes bon conseils... je t'aime.

«Ce sont les gens que l'on rencontre sur son chemin qui rendent le parcours inoubliable»

XII. RÉFÉRENCES

Abel E.D., Ahima R.S., Boers M.E., Elmquist J.K., Wondisford F.E. (2001) Critical role for thyroid hormone beta 2 receptor in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest* 107: 1017-23.

Adams C. C., Workman J. L. (1993). Nucleosome displacement in transcription. *Cell* 72: 305-308.

Alland L., Muhle R., Hou H. J., Potes J., Chin L., Schreiber-Agus N., DePinho R. A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387: 49-55.

Anderson G.W. (2001) Thyroid hormones and the brain. *Front Neuroendocrinol.* Jan;22(1):1-17. Review.

Andersson M. L., Nordstrom K., Demczuk S., Harbers M., Vennstrom B. (1992). Thyroid hormone alters the DNA binding properties of chicken thyroid hormone receptors alpha and beta. *Nucleic Acids Res* 20: 4803-4810.

Au-Fliegner M., Helmer E., Casanova J., Raaka B. M., Samuels H. H. (1993). The conserved ninth C-terminal heptad in thyroid hormone and retinoic acid receptors mediates diverse

responses by affecting heterodimer but not homodimer formation. *Mol Cell Biol* 13: 5725-5737.

Baniahmad A., Ha I., Reinberg D., Tsai S., Tsai M. J., O'Malley B. W. (1993). Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8832-8836.

Baniahmad A., Kohne A. C., Renkawitz R. (1992). A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *EMBO J* 11: 1015-1023.

Baniahmad A., Steiner C., Kohne A., Renkawitz R. (1990). Molecular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* 61: 505-514.

Banker D.E., Bigler J., Eisenman R.N. (1991). The thyroid hormone receptor gene (c-erbA alpha) is expressed in advance of thyroid gland maturation during the early embryonic development of *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol.* 11(10): 5079-89.

Barettino D., Vivanco Ruiz M. M., Stunnenberg H. G. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *EMBO J* 13: 3039-3049.

Bernal J. (1999). Iodine and brain development. *Biofactors* 10: 271-276.

Blanco J. C., Minucci S., Lu J., Yang X. J., Walker K. K., Chen H., Evans R. M., Nakatani Y., Ozato K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* 12: 1638-1651.

Bodenner D. L., Mroczynski M. A., Weintraub B. D., Radovick S., Wondisford F. E. (1991). A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *J Biol Chem* 266: 21666-21673.

Bradley D. J., Towle H. C., Young W. S. (1994). Alpha and beta thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 439-443.

Brent G. A., Harney J. W., Chen Y., Warne R. L., Moore D. D., Larsen P. R. (1989). Mutations of the rat growth hormone promoter which increase and decrease response to thyroid hormone define a consensus thyroid hormone response element. *Mol endocrinol* 3: 1996-2004.

Bugge T.H., Suh T.T., Flick M.J., Daugherty C.C., Romer J., Solberg H., Ellis V., Dano K., Degen J.L. (1995) The receptor for urokinase-type plasminogen activator is not essential for

mouse development or fertility. *J Biol Chem.* 270(28):16886-94.

Burris T. P., Nawaz Z., Tsai M. J., O'Malley B. W. (1995). A nuclear hormone receptor-associated protein that inhibits transactivation by the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9525-9529.

Carr F. E., Wong N. C. (1994). Characteristics of a negative thyroid hormone response element. *J Biol Chem* 269: 4175-4179.

Casanova J., Helmer E., Selmi-Ruby S., Qi J. S., Au-Fliegner M., Desai-Yajnik V., Koudinova N., Yarm F., Raaka B. M., Samuels H. H. (1994). Functional evidence for ligand-dependent dissociation of thyroid hormone and retinoic acid receptors from an inhibitory cellular factor. *Mol Cell Biol* 14: 5756-5765.

Cavailles V., Dauvois S., Danielian P.S., Parker M.G. (1994) Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(21):10009-13.

Cavailles V., Dauvois S., L'Horset F., Lopez G., Hoare S., Kushner P. J., Parker M. G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J* 14: 3741-3751.

Coffer A., Cavailles V., Knowles P., Pappin D. (1996) Biochemical characterization and novel isolation of pure estrogen receptor hormone-binding domain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 58(5-6):467-77.

Collingwood T.N. Urnov F.D., Wolffe A.P. (1999) Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *Journal of Molecular Endocrinology* 23: 255-275

Chakravarti D., LaMorte V. J., Nelson M. C., Nakajima T., Schulman I. G., Juguilon H., Montminy M., Evans R. M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383: 99-103.

Chassande O., Fraichard A., Gauthier K., Flamant F., Legrand C., Savatier P., Laudet V., Samarut J. (1997) Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the *c-erbA* alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol Endocrinol.* 11(9):1278-90.

Chatterjee V.K., Nagaya T., Madison L.D., Datta S., Rentoumis A., Jameson J.L. (1991) Thyroid hormone resistance syndrome. Inhibition of normal receptor function by mutant thyroid hormone receptors. *J Clin Invest.* Jun; 87(6):1977-84.

Chen H., Lin R. J., Schiltz R. L., Chakravarti D., Nash A., Nagy L., Privalsky M. L., Nakatani

Y., Evans R. M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90: 569-580.

Chen J. D., Evans R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377: 454-457.

Danielian P.S., White R., Lees J.A., Parker M.G. (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11(3):1025-33.

Davis F. B., Moffett M. J., Davis P. J., Al Ogaily M. S., Blas S. D. (1993). Inositol phosphates modulate binding of thyroid hormone to human red cell membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1427-1430.

Davis P.J., Davis FB. (1996) Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid*. Oct; 6(5): 497-504.

Desvergne B., Petty K. J., Nikodem V. M. (1991). Functional characterization and receptor binding studies of the malic enzyme thyroid hormone response element. *J Biol Chem* 266: 1008-1013.

Ding X. F., Anderson C. M., Ma H., Hong H., Uht R. M., Kushner P. J., Stallcup M. R. (1998). Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol endocrinol* 12: 302-313.

Dussault J. H., Ruel J. (1987). Thyroid hormones and brain development. *Annu Rev Physiol* 49: 321-334.

Evans R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.

Feng X., Jiang Y., Meltzer P., Yen P. (2000) Thyroid Hormone Regulation of Hepatic Genes in Vivo Detected by Complementary DNA Microarray. *Molecular Endocrinology* 14: 947-55.

Fondell J. D., Roy A. L., Roeder R. G. (1993). Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes Dev* 7: 1400-1410.

Forman B. M., Casanova J., Raaka B. M., Ghysdael J., Samuels H. H. (1992). Half-site spacing and orientation determines whether thyroid hormone and retinoic acid receptors and related factors bind to DNA response elements as monomers, homodimers, or heterodimers. *Mol endocrinol* 6: 429-442.

Forman B. M., Samuels H. H. (1990). Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. *Mol endocrinol* 4: 1293-1301.

Forrest D. (1994). The *erbA*/thyroid hormone receptor genes in development of the central nervous system. *Semin Cancer Biol* 5: 167-176.

Forrest D., Sjoberg M., Vennstrom B. (1990). Contrasting developmental and tissue-specific expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes. *EMBO J* 9: 1519-1528. Forrest D., Vennstrom B. (2000) Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid*. 2000 Jan;10(1):41-52.

Gick G. G., Ismail-Beigi F. (1990). Thyroid hormone induction of Na(+)-K(+)-ATPase and its mRNAs in a rat liver cell line. *Am J Physiol* 258: C544-51.

Giguere A., Fortier S., Beaudry C., Gallo-Payet N., Bellabarba D. (1996). Effect of thyroid hormones on G proteins in synaptosomes of chick embryo. *Endocrinology* 137: 2558-2564.

Glass C. K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15: 391-407.

Glass C. K., Franco R., Weinberger C., Albert V. R., Evans R. M., Rosenfeld M. G. (1987). A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. *Nature* 329: 738-741.

Glass C. K., Holloway J. M., Devary O. V., Rosenfeld M. G. (1988). The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell* 54: 131-323.

Glass C. K., Lipkin S. M., Devary O. V., Rosenfeld M. G. (1989). Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell* 59: 697-708.

Glineur C., Bailly M., Ghysdael J. (1989) The c-erbA alpha-encoded thyroid hormone receptor is phosphorylated in its amino terminal domain by casein kinase II. *Oncogene* 4(10):1247-54.

Goldberg Y., Glineur C., Gesquiere J.C., Ricouart A., Sap J., Vennstrom B., Ghysdael J. (1988) Activation of protein kinase C or cAMP-dependent protein kinase increases phosphorylation of the c-erbA-encoded thyroid hormone receptor and of the v-erbA-encoded protein. *EMBO J* 7(8): 2425-33.

Graham J. M., Green C. (1969). The binding of hormones and related compounds by normal and cholesterol-depleted plasma membranes of rat liver. *Biochem Pharmacol* 18: 493-502.

Greenspan F. S. (2001). Basic and clinical endocrinology. 5^e édition, Appleton et Lange, 823 pages.

Grignani F., De Matteis S., Nervi C., Tomassoni L., Gelmetti V., Cioce M., Fanelli M., Ruthardt M Ferrara F.F., Zamir I., Seiser C., Grignani F., Lazar M.A., Minucci S., Pelicci P.G. (1998) Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* (6669): 815-8.

Gronemeyer H., Moras D. (1995) Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature* 18; 375(6528):190-1.

Hadzic E., Desai-Yajnik V., Helmer E., Guo S., Wu S., Koudinova N., Casanova J., Raaka B. M., Samuels H. H. (1995). A 10-amino-acid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB. *Mol Cell Biol* 15: 4507-4517.

Hadzic E., Habeos I., Raaka B.M., Samuels H.H. (1998) A novel multifunctional motif in the amino-terminal A/B domain of T3Ralpha modulates DNA binding and receptor dimerization. *J Biol Chem* 273(17):10270-8.

Hafner R.P., Brown G.C., Brand M.D. (1990) Thyroid-hormone control of state-3 respiration in isolated rat liver mitochondria. *Biochem J.* 265(3):731-4.

Hartong R., Wang N., Kurokawa R., Lazar M. A., Glass C. K., Apriletti J. W., Dillmann W. H. (1994). Delineation of three different thyroid hormone-response elements in promoter of rat sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene. Demonstration that retinoid X receptor binds 5' to thyroid hormone receptor in response element 1. *J Biol Chem* 269: 13021-13029.

Harris D.R., Green W.L., Craelius W. (1991) Acute thyroid hormone promotes slow inactivation of sodium current in neonatal cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1095(2):175-81.

Heinzel T., Lavinsky R. M., Mullen T. M., Soderstrom M., Laherty C. D., Torchia J., Yang W. M., Brard G., Ngo S. D., Davie J., Seto E., Eisenman R. N., Rose D. W., Glass C. K., Rosenfeld M. G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387: 43-48.

Hodin R. A., Lazar M. A., Wintman B. I., Darling D. S., Koenig R. J., Larsen P. R., Moore D. D., Chin W. W. (1989). Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 244: 76-79.

Hollenberg A. N., Monden T., Flynn T. R., Boers M. E., Cohen O., Wondisford F. E. (1995). The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol endocrinol* 9: 540-550.

Hollenberg A. N., Monden T., Madura J. P., Lee K., Wondisford F. E. (1996). Function of nuclear co-repressor protein on thyroid hormone response elements is regulated by the receptor A/B domain. *J Biol Chem* 271: 28516-28520.

Horlein A. J., Naar A. M., Heinzel T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M., Glass C. K., Rosenfeld M. G. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377: 397-404.

Horwitz K. B., Jackson T. A., Bain D. L., Richer J. K., Takimoto G. S., Tung L. (1996). Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol endocrinol* 10: 1167-1177.

Jenster G., Spencer T.E., Burcin M.M. Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W. (1997) Steroid receptor induction of gene transcription: a two-step model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(15):7879-84.

Judelson C., Privalsky M. L. (1996). DNA recognition by normal and oncogenic thyroid hormone receptors. Unexpected diversity in half-site specificity controlled by non-zinc-finger determinants. *J Biol Chem* 271: 10800-10805.

Katz D., Lazar M. A. (1993). Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant (alpha 2) is due to competition for binding sites on target genes. *J Biol Chem* 268: 20904-20910.

Kawata M. (2001) Subcellular steroid/nuclear receptor dynamics. *Arch Histol Cytol.* Oct; 64(4):353-68. Review.

Kim H.J., Lee S.K., Na S.Y., Choi H.S., Lee J.W. (1998) Molecular cloning of xSRC-3, a novel transcription coactivator from *Xenopus*, that is related to AIB1, p/CIP, and TIF2. *Mol Endocrinol* 12(7):1038-47.

Kim H. S., Crone D. E., Sprung C. N., Tillman J. B., Force W. R., Crew M. D., Mote P. L., Spindler S. R. (1992). Positive and negative thyroid hormone response elements are composed of strong and weak half-sites 10 nucleotides in length. *Mol endocrinol* 6: 1489-1501.

King I. N., de Soyza T., Catanzaro D. F., Lavin T. N. (1993). Thyroid hormone receptor-induced bending of specific DNA sequences is modified by an accessory factor. *J Biol Chem* 268: 495-501.

Kliewer S. A., Umesono K., Mangelsdorf D. J., Evans R. M. (1992). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 355: 446-449.

Koenig R. J., Lazar M. A., Hodin R. A., Brent G. A., Larsen P. R., Chin W. W., Moore D. D. (1989). Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* 337: 659-661.

Horlein A.J., Narr A.M., Heinzl T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M., Glass C.K., et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377(6548):397-404.

Laflamme L., Hamann G., Messier N., Maltais S., Langlois M.F. (2002) The role of RXR in the regulation of genes of the hypothalamo-pituitary axis by thyroid hormone receptors. *Journal of Biological Chemistry*. (Submitted).

Langlois M. F., Bellabarba D., Wondisford F. E. (1997). RXR is an important cofactor in negative regulation of the TRH gene by thyroid hormone. *Thyroid* 7 suppl. 1: abstract 79.

Langlois M. F., Zanger K., Monden T., Safer J. D., Hollenberg A. N., Wondisford F. E. (1997). A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation

by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. *J Biol Chem* 272: 24927-24933.

Lanz R.B., McKenna N.J., Onate S.A. Albrecht U., Wong J., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W. (1999) A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97(1):17-27.

Laudet V., Hanni C., Coll J., Catzeflis F., Stehelin D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. (1992) *EMBO J.* 11(3):1003-13.

Lawrence W.D., Davis P.J., Blas S.D., Schoenl M. (1984) Interaction of thyroid hormone and sex steroids at the rabbit reticulocyte membrane in vitro: control by 17 beta-estradiol and testosterone of thyroid hormone-responsive Ca^{2+} -ATPase activity. *Arch Biochem Biophys.* 235(1):78-85.

Lawrence W.D., Schoenl M., Davis P.J. (1989) Stimulation in vitro of rabbit erythrocyte cytosol phospholipid-dependent protein kinase activity. A novel action of thyroid hormone. *J Biol Chem.* 264(9):4766-8.

Lazar M.A., Hodin R.A., Darling D.S., Chin W.W. (1988) Identification of a rat c-erbA alpha-related protein which binds deoxyribonucleic acid but does not bind thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 2(10):893-901.

Lazar M. A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 14: 184-193.

Le Douarin B., Garnier J. M., Lutz Y., Tora L., Pierrat P., Heery D., Gronemeyer H., Chambon P., Losson R. (1995). The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J* 14: 2020-2033.

Lechan R. M., Qi Y., Berrodin T. J., Davis K. D., Schwartz H. L., Strait K. A., Oppenheimer J. H., Lazar M. A. (1993). Immunocytochemical delineation of thyroid hormone receptor beta 2-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Endocrinology* 132: 2461-2469.

Lee C.H., Chinpaisal C., Wei L.N. (1998) Cloning and characterization of mouse RIP140, a corepressor for nuclear orphan receptor TR2. *Mol Cell Biol.* 18(11):6745-55.

Lee S.K., Kim H.J., Na S.Y., Kim T.S., Choi H.S., Im S.Y., Lee J.W. Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem.* 273(27):16651-4.

Li M., Boyages S. C. (1996). Detection of extended distribution of beta2-thyroid hormone

receptor messenger ribonucleic acid (RNA) in adult rat brain using complementary RNA in situ hybridization histochemistry. *Endocrinology* 137: 1272-1275.

Liu R. T., Suzuki S., Miyamoto T., Takeda T., Ozata M., DeGroot L. J. (1995). The dominant negative effect of thyroid hormone receptor splicing variant alpha 2 does not require binding to a thyroid response element. *Mol endocrinol* 9: 86-95.

Lui B.F., Xu W.X., Otwinowski Z., Freedman L.P., Yamamoto K.R., Sigler P.B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352(6335):497-505.

Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839.

Marieb E. N. (1998). *Anatomie et physiologie humaines*. 2^e édition, ERPI, 1194 pages.

Marks M. S., Hallenbeck P. L., Nagata T., Segars J. H., Appella E., Nikodem V. M., Ozato K. (1992). H-2RIIBP (RXR beta) heterodimerization provides a mechanism for combinatorial diversity in the regulation of retinoic acid and thyroid hormone responsive genes. *EMBO J* 11: 1419-1435.

Mathur M., Tucker P.W., Samuels H.H. (2001) PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol.* 21(7):2298-311.

McKenna N. J., Lanz R. B., O'Malley B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20: 321-344.

Meier C. A. (1997). Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors. *J of receptor and signal transduction research* 17: 319-335.

Messier N., Langlois M. F. (2000). Triac regulation of transcription is T3 receptor isoform- and response element-specific. *Mol Cell Endocrinol.*

Mitsuhashi T., Tennyson G.E., Kikodem V.M. (1988) Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(16):5804-8.

Miyamoto T., Suzuki S., DeGroot L. J. (1993). High affinity and specificity of dimeric binding of thyroid hormone receptors to DNA and their ligand-dependent dissociation. *Mol endocrinol* 7: 224-231.

Mowbrey J., Corrigan J. (1984) Short-term control of mitochondrial adenine nucleotide translocator by thyroid hormone. *Eur J Biochem.* 15;139(1): 95-9.

Nunoz A., Bernal J. (1997) Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur J Endocrinol.* 137(5):433-45.

Murray M. B., Zilz N. D., McCreary N. L., MacDonald M. J., Towle H. C. (1988). Isolation and characterization of rat cDNA clones for two distinct thyroid hormone receptors. *J Biol Chem* 263: 12770-12777.

Na S.Y., Lee S.K., Han S.J., Choi H.S., Im S.Y., Lee J.W. (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem.* 273(18):10831-4.

Naar A. M., Boutin J. M., Lipkin S. M., Yu V. C., Holloway J. M., Glass C. K., Rosenfeld M. G. (1991). The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 65: 1267-1279.

Nagpal S., Friant S., Nakshatri H., Chambon P. (1993) RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.* 12(6):2349-60.

Nagy L., Kao H. Y., Chakravarti D., Lin R. J., Hassig C. A., Ayer D. E., Schreiber S. L., Evans R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89: 373-380.

Nan X., Johnson C. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a HDAC complex. *Nature* 393 (6683): 386-9.

Nelson C. C., Hendy S. C., Faris J. S., Romaniuk P. J. (1996). Retinoid X receptor alters the determination of DNA binding specificity by the P-box amino acids of the thyroid hormone receptor. *J Biol Chem* 271: 19464-19474.

Nolte R.T., Wisely G.B., Westin S., Cobb J.E., Lambert M.H., Kurokawa R., Rosenfeld M.G., Willson T.M., Glass C.K., Milburn M.V. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395(6698):137-43.

Oesterreich S., Zhang Q.P., Lee A.V. (2000) Inhibition of oestrogen receptor activity by the co-repressor HET/SAF-B is relieved by blockade of histone deacetylase activity. *Eur J Cancer Suppl* 4:S43-4.

Ojamaa K., Balkman C., Klein I.L. (1993) Acute effects of triiodothyronine on arterial smooth muscle cells. *Ann Thorac Surg.* 56(1 Suppl:S61-6; discussion S66-7.

Ojamaa K., Klein I. (1993) In vivo regulation of recombinant cardiac myosin heavy chain gene expression by thyroid hormone. *Endocrinology*. 132(3):1002-6.

Onate S. A., Boonyaratanakornkit V., Spencer T. E., Tsai S. Y., Tsai M. J., Edwards D. P., O'Malley B. W. (1998). The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 273: 12101-12108.

Onate S. A., Tsai S. Y., Tsai M. J., O'Malley B. W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357.

Oppenheimer J.H. et Schwartz H.L. (1997). Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocrine Review* 18: 462-475.

Porterfield S. P., Hendrich C. E. (1993). The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development--current perspectives. *Endocr Rev* 14: 94-106.

Powers C.A., Mathur M., Raaka A.M., Ron D., Samuels H.H. (1998) TLS (Translocated-in-Liposarcoma) Is a High-Affinity Interactor for Steroid, Thyroid Hormone, and Retinoid Receptors. *Molecular Endocrinology* 12: 4-18.

Privalsky M.L., Yoh S.M. (2000) Resistance to thyroid hormone (RTH) syndrome reveals novel determinants regulating interaction of T3 receptor with corepressor. *Mol Cell Endocrinol.* Jan 25;159(1-2):109-24.

Rastinejad F., Perlmann T., Evans R.M., Sigler P.B. (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375(6528):203-11.

Ribeiro R.C., Apriletti J.W., Yen P.M., Chin W.W., Baxter J.D. (1994) Heterodimerization and deoxyribonucleic acid-binding properties of a retinoid X receptor-related factor. *Endocrinology.* 135(5):2076-85.

Ribeiro R.C., Apriletti J.W., West B.L., Wagner R.L., Fletterick R.J., Schaufele F., Baxter J.D. (1995) The molecular biology of thyroid hormone action. *Ann N Y Acad Sci.* 758:366-89.

Ribeiro R.C., Kushner P.J., Baxter J.D. (1995) The nuclear hormone receptor gene superfamily.

Annu Rev Med. 46:443-53.

Ribeiro R.C., Feng W., Wagner R.L., Costa C.H., Pereira A.C., Apriletti J.W., Fletterick R.J., Baxter J.D. Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain

for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. J Biol Chem. 2001 May 4;276(18):14987-95.

Rosen E. D., O'Donnell A. L., Koenig R. J. (1992). Ligand-dependent synergy of thyroid hormone and retinoid X receptors. J Biol Chem 267: 22010-22013.

Rudinger A., Mylotte K.M., Davis P.J., Davis F.B., Blas S.D. (1984) Rabbit myocardial membrane Ca²⁺-adenosine triphosphatase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone. Arch Biochem Biophys. 229(1):379-85.

Safer J. D., Langlois M. F., Cohen R., Monden T., John-Hope D., Madura J., Hollenberg A. N., Wondisford F. E. (1997). Isoform variable action among thyroid hormone receptor mutants provides insight into pituitary resistance to thyroid hormone. Mol endocrinol 11: 16-26.

Sakurai A., Nakai A., DeGroot L. J. (1989). Expression of three forms of thyroid hormone receptor in human tissues. Mol endocrinol 3: 392-399.

Sande S., Privalsky M. L. (1996). Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors. Mol endocrinol 10: 813-825.

Sap J., Munoz A., Damm K., Goldberg Y., Ghysdael J., Leutz A., Beug H., Vennstrom B. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324: 634-640.

Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*. 75(3):567-78.

Schwartz H. L., Lazar M. A., Oppenheimer J. H. (1994). Widespread distribution of immunoreactive thyroid hormone beta 2 receptor (TR beta 2) in the nuclei of extrapituitary rat tissues. *J Biol Chem* 269: 24777-24782.

Schwartz H. L., Strait K. A., Ling N. C., Oppenheimer J. H. (1992). Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J Biol Chem* 267: 11794-11799.

Schwille P., Haupts U., Maiti S., Webb W.W. (1999) Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys J*. Oct; 77(4):2251-65.

Segal J. (1989). A rapid, extranuclear effect of 3,5,3'-triiodothyronine on sugar uptake by several tissues in the rat in vivo. Evidence for a physiological role for the thyroid hormone action at the level of the plasma membrane. *Endocrinology* 124: 2755-2764.

Segal J., Ingbar S. H. (1989). Evidence that an increase in cytoplasmic calcium is the initiating event in certain plasma membrane-mediated responses to 3,5,3'-triiodothyronine in rat thymocytes. *Endocrinology* 124: 1949-1955.

Seol W., Choi H.S., Moore D.D. (1995) Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol.* 9(1):72-85.

Sharma M., Zarnegar M., Li X., Lim B., Sun Z. (2000) Androgen receptor interacts with a novel MYST protein, HBO1. *J Biol Chem.* 275(45):35200-8.

Shibata H., Spencer T. E., Onate S. A., Jenster G., Tsai S. Y., Tsai M. J., O'Malley B. W. (1997). Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res* 52: 141-164.

Siegrist-Kaiser C.A., Juge-Aubry C., Tranter M.P., Ekenbarger D.M., Leonard J.L. (1990) Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. *J Biol Chem.* 265(9):5296-302.

Sjoberg M., Vennstrom B., Forrest D. (1992). Thyroid hormone receptors in chick retinal development: differential expression of mRNAs for alpha and N-terminal variant beta receptors. *Development* 114: 39-47.

Sterling K., Milch P. O., Brenner M. A., Lazarus J. H. (1977). Thyroid hormone action: the mitochondrial pathway. *Science* 197: 996-999.

Sterling K., Brenner M.A. Thyroid hormone action: effect of triiodothyronine on mitochondrial adenine nucleotide translocase in vivo and in vitro. *Metabolism*. 1995 Feb;44(2):193-9.

Strait K. A., Schwartz H. L., Perez-Castillo A., Oppenheimer J. H. (1990). Relationship of c-erbA mRNA content to tissue triiodothyronine nuclear binding capacity and function in developing and adult rats. *J Biol Chem* 265: 10514-10521.

Tagami T., Jameson J. L. (1998). Nuclear corepressors enhance the dominant negative activity of mutant receptors that cause resistance to thyroid hormone. *Endocrinology* 139: 640-650.

Takeshita A., Yen P. M., Misiti S., Cardona G. R., Liu Y., Chin W. W. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* 137: 3594-3597.

Thenot S., Henriquet C., Rochefort H., Cavailles V. (1997) Differential interaction of nuclear receptors with the putative human transcriptional coactivator hTIF1. *J Biol Chem.* 272(18):12062-8.

Thompson C. C., Weinberger C., Lebo R., Evans R. M. (1987). Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science* 237: 1610-1614.

Tomura H., Lazar J., Phyllaier M., Nikodem V.M. (1995) The N-terminal region (A/B) of rat thyroid hormone receptors alpha 1, beta 1, but not beta 2 contains a strong thyroid hormone-dependent transactivation function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(12):5600-4.

Tone Y., Collingwood T. N., Adams M., Chatterjee V. K. (1994). Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor. *J Biol Chem* 269: 31157-31161.

Tong G.X., Jeyakumar M., Tanen M.R., Bagchi M.K. (1996) Transcriptional silencing by unliganded thyroid hormone receptor beta requires a soluble corepressor that interacts with the ligand-binding domain of the receptor. *Mol Cell Biol.* 16(5):1909-20.

Tsai M.J., O'Malley B.W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 63:451-86.

Umesono K., Murakami K. K., Thompson C. C., Evans R. M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65: 1255-1266.

Voegel J. J., Heine M. J., Zechel C., Chambon P., Gronemeyer H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* 15: 3667-3675.

Vom Baur E., Zechel C., Heery D., Heine M.J., Garnier J.M., Vivat V., Le Douarin B., Gronemeyer H., Chambon P., Losson R. (1996) Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J* 15(1):110-24.

Wagner R. L., Apriletti J. W., McGrath M. E., West B. L., Baxter J. D., Fletterick R. J. (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 378: 690-697.

Wang J.C., Stafford J.M., Granner D.K. (1998) SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem.* 273(47):30847-50.

Warnick P.R., Davis P.J., Davis F.B., Cody V., Galindo J. Jr, Blas S.D. (1993) Rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone analogues and bipyridines. *Biochim Biophys Acta.* 1153(2):184-90.

Weinberger C., Thompson C. C., Ong E. S., Lebo R., Gruol D. J., Evans R. M. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324: 641-646.

Williams GR. (2000) Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol.* 20(22):8329-42.

Wolffe A. P., Pruss D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84: 817-819.

Wong C. W., Privalsky M. L. (1998). Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor: multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB. *Mol Cell Biol* 18: 5500-5510.

Wood W. M., Ocran K. W., Gordon D. F., Ridgway E. C. (1991). Isolation and characterization of mouse complementary DNAs encoding alpha and beta thyroid hormone receptors from thyrotrope cells: the mouse pituitary-specific beta 2 isoform differs at the amino terminus from the corresponding species from rat pituitary tumor cells. *Mol endocrinol* 5: 1049-1061.

Yamano K, Miwa S. (1998) Differential gene expression of thyroid hormone receptor alpha and beta in fish development. *Gen Comp Endocrinol.* 109(1):75-85.

Yang Y., Burgos-Trinidad M., Wu Y., Koenig R. J. (1996). Thyroid hormone receptor variant alpha2. Role of the ninth heptad in dna binding, heterodimerization with retinoid X receptors, and dominant negative activity. J Biol Chem 271: 28235-28242.

Yaoita Y., Brown D. D. (1990). A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. Genes Dev 4: 1917-1924.

Yen P. M., Chin W. W. (1994). Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. Mol endocrinol 8: 1450-1454.

Yen P. M., Spanjaard R. A., Sugawara A., Darling D. S., Nguyen V. P., Chin W. W. (1993). Orientation and spacing of half-sites differentially affect T3-receptor (TR) monomer, homodimer, and heterodimer binding to thyroid hormone response elements (TREs). Endocrine J 1: 461-466.

Yen P. M., Sugawara A., Chin W. W. (1992). Triiodothyronine (T3) differentially affects T3-receptor/retinoic acid receptor and T3-receptor/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. J Biol Chem 267: 23248-23252.

Yen P.M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev. Jul;81(3):1097-142. Review.

Yoshida K., Davis P.J., Schoenl M. (1979) Dissociable and non-dissociable cytoplasmic protein-thyroid hormone interactions. *Biochim Biophys Acta*. 582(2):332-45.

Yu V., Delsert C., Andersen B., Holloway J. M., Devary O. V., Naar A. M., Kim S. Y., Boutin J. M., Glass C. K., Rosenfeld M. G. (1991). RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67: 1251-1266.

Zamir I., Dawson J., Lavinsky R. M., Glass C. K., Rosenfeld M. G., Lazar M. A. (1997). Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14400-14405.

Zhang X. K., Hoffmann B., Tran P. B., Graupner G., Pfahl M. (1992). Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 355: 441-446.

Zhang X. K., Pfahl M. (1993). Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homo- and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol Metab* 4: 156-162.

Zhang J., Lazar M.A. (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol*. 62:439-66.

Zhu Y.S., Yen P.M., Chin W.W., Pfaff D.W. (1996) Estrogen and thyroid hormone interaction on regulation of gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(22):12587-92.

XIII. Annexe A

Résultats de la recherche sur la banque de recherche génomique.

NCBI

BLAST Search Results

BLAST Entrez ?

BLASTN 2.0.14 [Jun-29-2000]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 965918389-8918-196

Query=

(342 letters)

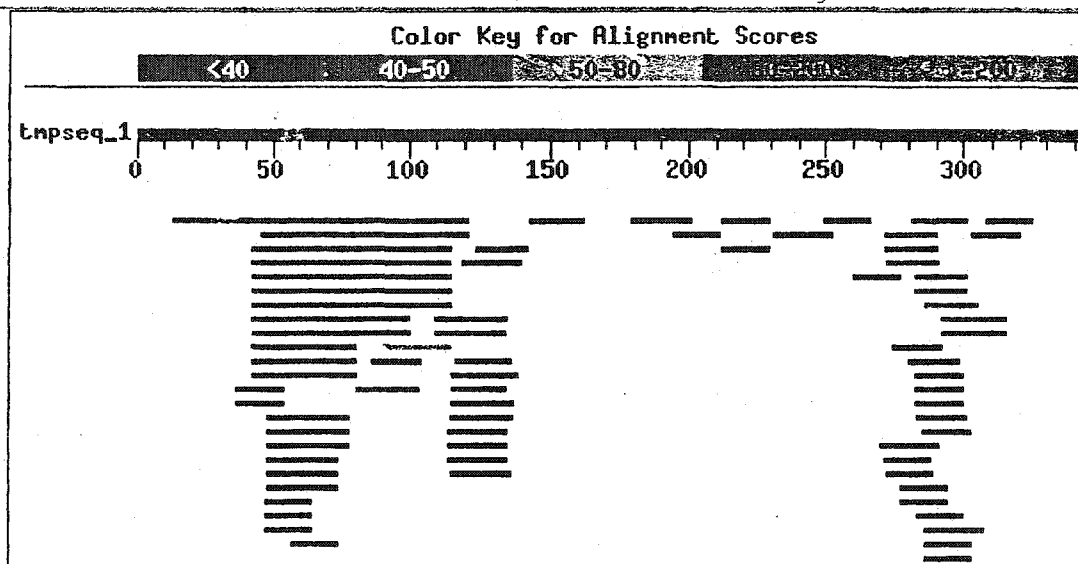
Database: nt

652,857 sequences; 2,165,985,380 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

Taxonomy reportsDistribution of 76 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show defline and scores. Click to show alignments



Alignments

>gb|U29899.1|CVU29899 Cloning vector pACT2 MatchmakerII, complete sequence
Length = 8117

Score = 180 bits (91), Expect = 2e-43
Identities = 106/110 (96%), Gaps = 1/110 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 14 accccaccaaaccanaaac-gagatctctatggcttaccatacgaatgttccagattac 72
|||||
Sbjct: 5104 accccaccaaaccnaaaagagatctgtatggcttaccatacgaatgttccagattac 5045

Query: 73 gctagcttgggtgggtcatatggccatggaggccccggggatccgaattcg 122
|||||
Sbjct: 5044 gctagcttgggtgggtcatatggccatggaggccccggggatccgaattcg 4995

>gb|AF071559.1|AF071559 Drosophila melanogaster histone deacetylase dHDAC3 mRNA, com
cds
Length = 1746

Score = 153 bits (77), Expect = 6e-35
Identities = 77/77 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 46 gcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggaggcc 105
|||||
Sbjct: 1 gcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggaggcc 60

Query: 106 ccggggatccgaattcg 122
|||||
Sbjct: 61 ccggggatccgaattcg 77

>gb|AF134167.1|AF134167 Yeast 2-hybrid vector pC-ACT.1 complete sequence
Length = 7389

Score = 147 bits (74), Expect = 3e-33
Identities = 74/74 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggag 102
|||||
Sbjct: 6800 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggag 6859

Query: 103 gccccggggatccg 116
|||||
Sbjct: 6860 gccccggggatccg 6873

>gb|AF134165.1|AF134165 Yeast 2-hybrid vector pCD.1 complete sequence
Length = 6205

Score = 147 bits (74), Expect = 3e-33
Identities = 74/74 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggag 102
|||||
Sbjct: 5616 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggag 5675

Query: 103 gccccggggatccg 116
|||||
Sbjct: 5676 gccccggggatccg 5689

>gb|U57443.1|CVU57443 Cloning vector pODB8, GAL4 DNA-binding domain vector, complete
sequence
Length = 6827

Score = 147 bits (74), Expect = 3e-33
Identities = 74/74 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggag 102
|||||
Sbjct: 2953 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggag 3012

Query: 103 gccccggggatccg 116
|||||
Sbjct: 3013 gccccggggatccg 3026

>gb|U46855.1|CVU46855 Cloning vector pAS1-tet tetracycline resistance gene, partial
TRP1 gene, complete cds, GAL4 (ADH1) gene, complete cds
Length = 7190

Score = 147 bits (74), Expect = 3e-33
Identities = 74/74 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggag 102
|||||
Sbjct: 5578 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggag 5637

Query: 103 gccccggggatccg 116
|||||
Sbjct: 5638 gccccggggatccg 5651

>gb|U30496.1|CVU30496 Cloning vector pAS2, complete sequence
Length = 8414

Score = 147 bits (74), Expect = 3e-33
Identities = 74/74 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggag 102
|||||
Sbjct: 5952 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggag 6011

Query: 103 gccccggggatccg 116
|||||
Sbjct: 6012 gccccggggatccg 6025

>[gb|AF134168.1|AF134168](#) Yeast 2-hybrid vector pC-ACT.2 complete sequence
Length = 7404

Score = 117 bits (59), Expect = 3e-24
Identities = 59/59 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatgga 101
|||||
Sbjct: 6800 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatgga 6858

>[gb|AF134166.1|AF134166](#) Yeast 2-hybrid vector pCD.2 complete sequence
Length = 6220

Score = 117 bits (59), Expect = 3e-24
Identities = 59/59 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatgga 101
|||||
Sbjct: 5616 atggcttaccatacgaatgttccagattacgctagcttgggtgggtcatatggccatgga 5674

>[gb|AF008932.1|AF008932](#) DNA-binding vector pODB80, complete sequence
Length = 6779

Score = 54.0 bits (27), Expect = 4e-05
Identities = 27/27 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 90 tatggccatggaggccccggggatccg 116
|||||
Sbjct: 2952 tatggccatggaggccccggggatccg 2978

>[gb|AF025395.1|AF025395](#) Cercopithecus aethiops B42b mRNA, complete cds
Length = 2591

Score = 46.1 bits (23), Expect = 0.009
Identities = 26/27 (96%)
Strand = Plus / Plus

Query: 110 ggatccgaattcgcggtcgcgtcgacg 136
|||||
Sbjct: 11 ggatccgaattcgcggtcgcgtcgacg 37

Score = 36.2 bits (18), Expect = 8.9
Identities = 21/22 (95%)
Strand = Plus / Plus

Query: 115 cgaattcgcggtcgcgtcgacg 136
|||||
Sbjct: 1315 cgaattcgcggtcgcgtcgacg 1336

>[gb|U555942.1|U555942](#) Expression vector pVP-HA3, complete sequence
Length = 3290

Score = 46.1 bits (23), Expect = 0.009
Identities = 35/39 (89%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 atggcttacccatacgaatgttccagattacgctagcttg 81
|||||
Sbjct: 257 atggcttacccatacgaatgttccagattacgctagcttg 295

>gb|U55941.1|CVU55941 Expression vector pVP-HA2, complete sequence
Length = 3286

Score = 46.1 bits (23), Expect = 0.009
Identities = 35/39 (89%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 atggcttacccatacgaatgttccagattacgctagcttg 81
|||||
Sbjct: 257 atggcttacccatacgaatgttccagattacgctagcttg 295

>gb|U55940.1|CVU55940 Expression vector pVP-HA1, complete sequence
Length = 3285

Score = 46.1 bits (23), Expect = 0.009
Identities = 35/39 (89%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 atggcttacccatacgaatgttccagattacgctagcttg 81
|||||
Sbjct: 257 atggcttacccatacgaatgttccagattacgctagcttg 295

>emb|AJ132592.1|HSA132592 Homo sapiens mRNA for zinc finger protein, 3115 BP X
Length = 3115

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.037
Identities = 25/26 (96%)
Strand = Plus / Plus

Query: 110 ggatccgaattcgcggtcgcgtcgac 135
|||||
Sbjct: 1 ggatccgaattcgcggtcgcgtcgac 26

>gb|U51225.1|AGU51225 Anopheles gambiae hexamerin (AgHexA) mRNA, complete cds
Length = 2137

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.14
Identities = 21/21 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 117 aattcgcggtcgcgtcgacgt 137
|||||
Sbjct: 1 aattcgcggtcgcgtcgacgt 21

>emb|AF023828.1|CEY17G7B Caenorhabditis elegans cosmid Y17G7B, complete sequence
Length = 143092

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.14
Identities = 21/21 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 282 ctttgaaaaaatcttcaaaaa 302
|||||||
Sbjct: 29307 ctttgaaaaaatcttcaaaaa 29287

>[gb|AC026439.3|AC026439](#) Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2267H19, complete sequen
Length = 105080

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 23/24 (95%)
Strand = Plus / Plus

Query: 81 ggggtggatcatatggccatggaggc 104
|||||||
Sbjct: 63690 ggggtggatcatctggccatggaggc 63713

>[gb|AF217749.1|AF217749](#) Homo sapiens protocadherin 3H (PCDH3H) mRNA, complete cds
Length = 4230

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 272 atgatatcaactttgaaaaa 291
|||||||
Sbjct: 2622 atgatatcaactttgaaaaa 2603

>[gb|AC007659.2|AC007659](#) Arabidopsis thaliana chromosome II section 241 of 255 of the
sequence. Sequence from clones T13E15, T14P1
Length = 87885

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 287 aaaaaatcttcaaaaagcca 306
|||||||
Sbjct: 86885 aaaaaatcttcaaaaagcca 86866

>[gb|AC002087.1|HSAC002087](#) Human BAC clone GS1-113D4 from 5p15.2, complete sequence [
Length = 154028

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 144 actgaagtcaaaaaagggtta 163
|||||||
Sbjct: 115231 actgaagtcaaaaaagggtta 115250

>[gb|AC005752.1|AC005752](#) Homo sapiens chromosome 5, BAC clone 182a8 (LBNL H161), comp
sequence
Length = 101072

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 272 atgatatcaactttgaaaaa 291

|||||
Sbjct: 99858 atgatatcaactttgaaaaa 99877

>gb|AF014375.1|AF014375 Medicago sativa putative JUN kinase activation domain bindin
mRNA, complete cds
Length = 1321

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 23/24 (95%)
Strand = Plus / Minus

Query: 116 gaattcgcggtcgcgtcgacgttg 139
|||||
Sbjct: 1321 gaattcgcggtcgcgtcgacgttg 1298

>emb|AL117204.1|CEY116A8C Caenorhabditis elegans cosmid Y116A8C, complete sequence
Length = 260341

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 283 tttgaaaaaatcttcaaaaa 302
|||||
Sbjct: 82928 tttgaaaaaatcttcaaaaa 82909

>emb|Y17298.1|CEY17298 Cunninghamella elegans mRNA for enolase
Length = 1417

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 116 gaattcgcggtcgcgtcgac 135
|||||
Sbjct: 1 gaattcgcggtcgcgtcgac 20

>emb|AL121969.11|HSJ214M20 Human DNA sequence from clone RP1-214M20 on chromosome 6p
complete sequence [Homo sapiens]
Length = 108205

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 23/24 (95%)
Strand = Plus / Minus

Query: 293 tcttcaaaaagccagatttactg 316
|||||
Sbjct: 12195 tcttcaaaaagccagtttactg 12172

>emb|AL109918.25|HSDJ152L7 Human DNA sequence from clone RP1-152L7 on chromosome 6p1
Contains the gene for PTD011 protein, the GSTA2
(glutathione S-transferase A2) gene, a novel mRNA, ESTs,
STSs, GSSs and CpG Islands, complete sequence [Homo
sapiens]
Length = 175940

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 23/24 (95%)
Strand = Plus / Minus

Query: 293 tcttcaaaaagccagattctactg 316
|||||||
Sbjct: 136200 tcttcaaaaagccagtttctactg 136177

>emb|AL035693.19|HS33B19 Human DNA sequence from clone RP1-33B19 on chromosome 6p24.
Contains part of the gene for
GDP-D-mannose-4,6-dehydratase and GSSs, complete sequence
[Homo sapiens]
Length = 142807

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 273 tgatatcaactttgaaaaaa 292
|||||||
Sbjct: 46104 tgatatcaactttgaaaaaa 46123

>emb|AL034392.1|CEY40B1A Caenorhabditis elegans cosmid Y40B1A, complete sequence
Length = 28054

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.57
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 283 tttgaaaaaatcttcaaaaa 302
|||||||
Sbjct: 20708 tttgaaaaaatcttcaaaaa 20727

>gb|AC007678.3|AC007678 Homo sapiens clone RP11-256K9, complete sequence
Length = 109173

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 283 tttgaaaaaatcttcaaaa 301
|||||||
Sbjct: 103260 tttgaaaaaatcttcaaaa 103242

>ref|NC_001808.1|Ceratottherium simum mitochondrion, complete genome
Length = 16832

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 37 atctctatggcttacccat 55
|||||||
Sbjct: 7033 atctctatggcttacccat 7051

>gb|AE003829.1|AE003829 Drosophila melanogaster genomic scaffold 142000013386047 sec
52, complete sequence
Length = 258492

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 22/23 (95%)
Strand = Plus / Plus

Query: 180 aaaaaaaccaaagacgggcgcaaa 202
|||||
Sbjct: 23901 aaaaaaaccaaagatgggcgcaaa 23923

>gb|U37458.1|CVU37458 Yeast CUP1 expression-multicopy (2micron) cloning vector YRTAG
with the hemagglutinin tag sequence, complete sequence.
selection)
Length = 6624

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 25/27 (92%)
Strand = Plus / Plus

Query: 49 tacccatac gatgttccagattacgct 75
|||||
Sbjct: 3103 tacccatac gatgttccagactacgct 3129

>gb|U37457.1|CVU37457 Yeast CUP1 expression-CEN/ARS cloning vector YATAG200 with the
hemagglutinin tag sequence, complete sequence
Length = 5781

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 25/27 (92%)
Strand = Plus / Minus

Query: 49 tacccatac gatgttccagattacgct 75
|||||
Sbjct: 2834 tacccatac gatgttccagactacgct 2808

>gb|AF088910.1|AF088910 Mus musculus Ikb kinase-beta (Ikbb) mRNA, complete cds
Length = 4039

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 22/23 (95%)
Strand = Plus / Plus

Query: 116 gaattcgcggtcgcgctcgacgtt 138
|||||
Sbjct: 61 gaattcgcgcccgcgctcgacgtt 83

>gb|AF110185.1|AF110185 Burkholderia pseudomallei strain 1026b DbhB (dbhB), general
pathway protein D (gspD), general secretory pathway
protein E (gspE), general secretory pathway protein F
(gspF), GspC (gspC), general secretory pathway protein G
(gspG), general sec>
Length = 20302

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 125 gtcgcgtcgacgttgccg 143
|||||
Sbjct: 2276 gtcgcgtcgacgttgccg 2294

>emb|Z50109.1|CEC09H10 Caenorhabditis elegans cosmid C09H10, complete sequence
Length = 40453

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3

Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 283 tttgaaaaaatcttcaaaa 301
|||||||
Sbjct: 1539 tttgaaaaaatcttcaaaa 1557

>emb|Z31585.1|CET05E12 Caenorhabditis elegans cosmid T05E12, complete sequence
Length = 22278

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 283 tttgaaaaaatcttcaaaa 301
|||||||
Sbjct: 7523 tttgaaaaaatcttcaaaa 7541

>emb|AL049844.7|HSJ468K18 Human DNA sequence from clone 468K18 on chromosome 6q24.1-
part of a gene for KIAA0680 protein, a pseudogene similar
to pantophysin, PLAGL1(pleiomorphic adenoma gene-like 1),
ESTs, STSS, GSSs and a CpG Island, complete sequence [Homo
sapiens]
Length = 137387

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 275 atatcaactttgaaaaaat 293
|||||||
Sbjct: 44549 atatcaactttgaaaaaat 44567

>emb|AX001451.1|AX001451 Sequence 6 from Patent WO9859040
Length = 3972

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 22/23 (95%)
Strand = Plus / Plus

Query: 116 gaattcgcggtcgcgtcgacgtt 138
|||||||
Sbjct: 1 gaattcgcggccgcgtcgacgtt 23

>gb|S71745.1|S71745 influenza virus hemagglutinin 5' epitope tag=fusion protein
(frame 3, multiple cloning site) [Saccharomyces
cerevisiae=yeast, cloning vector YCpIF15,16,17, Other
Plasmid Synthetic Partial, 169 nt]
Length = 169

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 28/31 (90%)
Strand = Plus / Plus

Query: 49 tacccatagcatgttccagattacgctagct 79
|||||||
Sbjct: 10 tacccatagcatgttccagattacgctagct 40

>gb|S71742.1|S71742 influenza virus hemagglutinin 5' epitope tag=fusion protein

{frame 2, multiple cloning site} [Saccharomyces
cerevisiae=yeast, cloning vector YCpIF15,16,17, Other
Plasmid Synthetic Partial, 151 nt]
Length = 151

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 28/31 (90%)
Strand = Plus / Plus

Query: 49 taccatacgaatgttcagattacgctagct 79
||||||| || ||||| |||||
Sbjct: 10 taccatacgaatgttcagattacgctagct 40

>gb|S71730.1|S71730 influenza virus hemagglutinin 5' epitope tag=fusion protein
{frame 1, multiple cloning site} [Saccharomyces
cerevisiae=yeast, cloning vector YCpIF15,16,17, Other
Plasmid Synthetic Partial, 135 nt]
Length = 135

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 28/31 (90%)
Strand = Plus / Plus

Query: 49 taccatacgaatgttcagattacgctagct 79
||||||| || ||||| |||||
Sbjct: 10 taccatacgaatgttcagattacgctagct 40

>gb|U30497.1|CVU30497 Cloning vector pAS2-1, complete sequence
Length = 8392

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 87 tcatatggccatggaggcc 105
|||||||
Sbjct: 5968 tcatatggccatggaggcc 5986

>gb|U41995.1|CELE02C12 Caenorhabditis elegans cosmid E02C12
Length = 41169

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 284 ttgaaaaaatcttcaaaaa 302
|||||||
Sbjct: 23803 ttgaaaaaatcttcaaaaa 23821

>gb|U37456.1|CVU37456 Yeast CUP1 expression/integration cloning vector YITAG100 with
hemagglutinin tag sequence, complete sequence
Length = 5275

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 25/27 (92%)
Strand = Plus / Plus

Query: 49 taccatacgaatgttcagattacgct 75
||||||| ||||| |||||

Sbjct: 2722 tacccatacgacgttccagactacgct 2748

>emb|Z26590.1|MV4LYSAB Bacteriophage mv4 lysA and lysB genes
Length = 2796

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 286 gaaaaaatcttcaaaaagc 304

|||||

Sbjct: 1709 gaaaaaatcttcaaaaagc 1727

>emb|Y07726.1|MTCSXX Ceratotherium simum complete mitochondrial DNA sequence
Length = 16832

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 37 atctctatggcttacccat 55

|||||

Sbjct: 7033 atctctatggcttacccat 7051

>gb|J03162.1|ECOHSDE E.coli EcoE type I restriction-modification enzyme S subunit (h
gene, complete cds
Length = 2136

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.3
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 281 actttgaaaaaatcttcaa 299

|||||

Sbjct: 1774 actttgaaaaaatcttcaa 1756

>gb|AC003096.2|AC003096 Arabidopsis thaliana chromosome II section 191 of 255 of the
sequence. Sequence from clones T31E10, T29F13
Length = 72919

Score = 36.2 bits (18), Expect = 8.9
Identities = 18/18 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 278 tcaactttgaaaaaatct 295

|||||

Sbjct: 4996 tcaactttgaaaaaatct 4979

Database: nt

Posted date: Aug 8, 2000 9:53 PM

Number of letters in database: -2,128,981,916

Number of sequences in database: 652,857

Lambda	K	H
1.37	0.711	1.31

Gapped

Lambda	K	H
1.37	0.711	1.31